

***Haloferax alexandrinus*'TAN ASİMİLE EDİCİ NİTRİT
REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Sinem DABAĞOĞLU
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Temmuz-2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1106 F 119**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sinem Dabağoğlu'nun "*Haloferax alexandrinus*'tan asimile edici nitrit redüktaz enziminin saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 02/07/2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Yrd. Doç. Dr. Volkan KILIÇ
Üye :	Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU
Üye :	Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Haloferax alexandrinus*'TAN ASİMİLE EDİCİ NİTRİT REDÜKTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Sinem DABAĞOĞLU

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yard. Doç. Dr. Volkan KILIÇ
2015, 53 sayfa**

Bu tez çalışmasında halofilik arke *Haloferax alexandrinus*'tan asimile edici nitrit redüktazın (NiR) saflaştırılması ve bu enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Haloferax alexandrinus asimile edici nitrit redüktaz enzimi 34,5 kat saflaştırılmıştır. Saf enzimin sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAJE) analizleri NiR'in 62 kDa moleküler ağırlığında bir monomer olduğunu göstermiştir.

H. alexandrinus'un nitrit ve metil viyolojen için K_m değerleri sırasıyla 8,25 mM ve 1,46 mM'dir. Asimile edici nitrit redüktazın optimum pH'ı 7.5 ve optimum sıcaklığı 60°C'dir. 3.5 M NaCl konsantrasyonunda maksimum aktivite ölçülmüştür ve aynı konsantrasyonlardaki KCl varlığında enzim aktivitesi ikiye katlanmıştır.

H. alexandrinus'un enzim aktivitesi siyanür, azid, etilendiamin tetra asetik asit, klorat ve sülfid varlığında düşmüştür. Ancak ditionitrolün enzim aktivitesi üzerine bir etkisi yoktur.

Anahtar Kelimeler: *Haloferax alexandrinus*, Asimile Edici Nitrit Redüktaz, Halofil, Arke

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ASSIMILATORY NITRITE REDUCTASE FROM *Haloferax alexandrinus*

Sinem DABAĞOĞLU

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Volkan KILIÇ
2015, 53 pages

It is aimed to purify assimilatory nitrite reductase (NiR) and to determine biochemical properties of this enzyme from halophilic archaeon *Haloferax alexandrinus* in this thesis.

Assimilatory nitrite reductase from *Haloferax alexandrinus* was purified 34,5-fold. Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of the purified enzyme showed that NiR was a monomer with molecular weight of 62 kDa.

K_m values of *H. alexandrinus* for nitrite and methyl viologen were 8,25 mM and 1,46 mM respectively. The optimal pH value of the assimilatory nitrite reductase was 7.5 and the optimal temperature was 60°C. Maximum NiR activity was measured at 3.5 M NaCl concentration and the enzyme activity was doubled in the presence of KCl at the same concentrations.

NiR enzyme activity of *H. alexandrinus* decreased in the presence of cyanide, azide, ethylenediamine tetra acetic acid, chlorate, and sulfite. However dithiothreitol had no effect on the activity of the enzyme.

Keywords: *Haloferax alexandrinus*, Assimilatory Nitrite Reductase, Halophile, Archaea

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yardımını, bilgisini ve desteğini esirgemeyen, çalışma konumun seçiminden çalışmamın bitimine kadar her zaman yanımda olan, çalışmam sırasında karşılaştığım her problemi kolayca çözebilen, pozitifliği ve güler yüzlülüğüyle beni her zaman motive edebilen danışman hocam Yard. Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a;

Bu çalışmadaki küçük ayrıntıları yorumlayarak büyük sonuçlar elde etmemde katkı sağlayan İspanya Alicante Üniversitesi'nden Dr. Rosa Maria MARTÍNEZ-ESPINOSA'ya;

Bana her zaman sabır gösteren, en yoğun anlarında bile sorularımı cevapsız bırakmayan, bilgilerini cömertçe paylaşan, zamansızlık yaşadığım anlarda bana kocaman zamanlar yaratan, geleceğin önemli bilim insanlarından, dostlarım Erhan ASLAN, Hatice GENÇ, Nurçin KÜÇÜKOĞLU'na ve bu çalışmaya bir şekilde katkısı bulunan tüm laboratuvar arkadaşlarıma;

Bugünlere gelmemi sağlayan, seçimlerimin sorgulamadan arkasında olan ve doğduğum günden itibaren beni maddi ve manevi olarak her zaman destekleyen hayatımdaki en değerli insan anneme;

Bilime verdiği değer sayesinde bana gösterdiği sonsuz sabır, özveri ve sevginin yanı sıra her an yanımda olan, beni desteklemekten asla vazgeçmeyen ve bu süreci tamamlamamdaki en büyük motivasyon kaynağım Canberk PSAV'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Sinem DABAĞOĞLU

Temmuz, 2015

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Archaea Domaini.....	1
1.2. Halofillik	2
1.3. <i>Haloferax alexandrinus</i>	2
1.4. Azot Döngüsü.....	3
1.4.1. Nitratın nitrite ve amonyuma indirgenmesi	5
1.4.2. Asimile edici nitrit redüktazlar	7
1.4.2.1. Halofilik asimile edici nitrit redüktazların biyokimyasal özellikleri	9
1.5. Amaç	10
2. MATERYAL VE YÖNTEM	11
2.1. Materyal.....	11
2.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizma.....	11
2.1.2. Çalışmada kullanılan besiyeri	11
2.1.3. Çalışmada kullanılan solüsyonlar.....	12
2.2. Yöntem	16
2.2.1. Liyofilize kültürün maksimal ve minimal besiyerinde geliştirilmesi	16
2.2.2. <i>Haloferax alexandrinus</i> 'un potasyum nitrit varlığındaki büyüme eğrisinin çıkartılması	16

2.2.3. Nitrit redüktaz aktivitesinin en yüksek olduğu üreme fazının belirlenmesi.....	16
2.2.4. Enzim ekstraksiyonunun hazırlanması	17
2.2.5. Nitrit redüktaz (NiR) enzim aktivitesinin belirlenmesi	17
2.2.6. Nitrit redüktaz enziminin saflaştırılması.....	18
2.2.6.1. Ham ekstraktın hazırlanması	18
2.2.6.2. Sefaroz 4B kolonunun hazırlanması.....	18
2.2.6.3. Dietil amino etil (DEAE) selüloz kolonunun hazırlanması.....	19
2.2.6.4. Q-Sefaroz kolonunun hazırlanması	20
2.2.7. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	20
2.2.8. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAJE)	20
2.2.9. <i>Haloferax alexandrinus</i> 'tan elde edilen NiR'in biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	21
2.2.9.1. NiR enzim aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığının etkisinin belirlenmesi	21
2.2.9.2. NiR aktivitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi	21
2.2.9.3. NiR enzim aktivitesi üzerine KCl ve MgCl ₂ gibi farklı tuzların etkisinin belirlenmesi	21
2.2.9.4. NiR enzim aktivitesi üzerine siyanürün etkisinin belirlenmesi	22
2.2.9.5. NiR enzim aktivitesi üzerine etilendiamin tetraasetik asidin (EDTA) etkisinin belirlenmesi	22
2.2.9.6. NiR enzim aktivitesi üzerine ditiotritol (DTT) etkisinin belirlenmesi	22
2.2.9.7. NiR enzim aktivitesi üzerine azidin etkisinin belirlenmesi	22
2.2.9.8. NiR enzim aktivitesi üzerine kloratın etkisinin belirlenmesi	22
2.2.9.9. NiR enzim aktivitesi üzerine sülfitin etkisinin belirlenmesi	22

2.2.10. NiR kinetik aktivitesinin analiz edilmesi.....	23
3. BULGULAR	24
3.1. <i>Haloferox alexandrinus</i> 'un Potasyum Nitrit Varlığındaki Büyüme Eğrisinin Çıkartılması	24
3.2. NiR Enzim Aktivitesinin Maksimum Olduğu Büyüme Fazının Belirlenmesi	24
3.3. Saflaştırma.....	25
3.3.1. Sefaroz 4B kolonu	25
3.3.2. DEAE-Selüloz kolonu.....	26
3.3.3. Q-Sefaroz kolonu	27
3.4. NiR'in SDS-PAJE Analizi ve Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi.....	29
3.5. <i>Haloferox alexandrinus</i> 'tan Elde Edilen NiR'in Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	30
3.5.1. NiR enzim aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığının etkisinin belirlenmesi	30
3.5.2. NiR enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi	31
3.5.3. NiR enzim aktivitesi üzerine KCl ve MgCl ₂ gibi farklı tuzların etkisi	32
3.5.4. NiR enzim aktivitesi üzerine siyanürün etkisi.....	33
3.5.5. NiR enzim aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi	34
3.5.6. NiR enzim aktivitesi üzerine DTT'nin etkisi	35
3.5.7. NiR enzim aktivitesi üzerine azidin etkisi.....	36
3.5.8. NiR enzim aktivitesi üzerine kloratın etkisi.....	37
3.5.9. NiR enzim aktivitesi üzerine sülfidin etkisi	38
3.6. NiR Enziminin Kinetik Aktivitesinin Analizi	39
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Azot döngüsünün önemli basamakları.....	5
3.2. NiR aktivitesinin hücrelerin büyümesi sırasındaki gelişimi	25
3.3. Sefaroz-4B kromatogramı	26
3.4. DEAE-Selüloz kromatogramı	27
3.5. Q-Sefaroz kromatogramı.....	28
3.6. NiR enziminin SDS-PAJE görüntüsü	30
3.7. NiR enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın ve inkübasyonun etkisi	31
3.8. pH'ın NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	32
3.9. Çeşitli tuzların farklı konsantrasyonlarının NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi	33
3.10. Siyanürün NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	34
3.11. EDTA'nın NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi	35
3.12. DTT'nin NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi	36
3.13. Azidin NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi	37
3.14. Potasyum kloratın NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi	38
3.15. Sülfitin NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi	39
3.17. NiR enziminin KNO_2 için Lineweaver-Burke grafiği	40
3.18. NiR enziminin MV için Lineweaver-Burke grafiği	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. Enzim saflaştırma basamakları	29
--	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

gr	: Gram
mg	: Miligram
M	: Molar
mM	: Milimolar
l	: Litre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece
nm	: Nanometre
kDa	: Kilodalton
öNAS	: Ökaryot nitrat redüktazları
NAP	: Periferik nitrat redüktazlar
NAR	: Solunum nitrat redüktazları
NAS	: Asimile edici nitrat redüktaz
NiR	: Asimile edici nitrit redüktaz
MV	: Metil viyolojen
DT	: Sodyum ditiyonit
DEAE	: Dietil amino etil
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PAJE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
rpm	: Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)
g	: Relative centrifugal force (nispi santrifüj gücü)
NEDA	: N-(1-naftil)-etilendiamin-dihidroklorür
DTT	: Ditiotreitol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
pHMB	: Biguanid hidroklorür
DPIP	: 2,6-diklorofenol indofenol
PMS	: Fenazin metosülfat

1. GİRİŞ

Geçmişte bitkiler ve hayvanlar şeklinde iki gruba ayrılan sınıflandırma sistemi, özellikle bakteri ve diğer prokaryot hücre yapısına sahip canlıları sınıflandırmada yaşanan zorluklar nedeniyle, 20. yüzyılın ortalarında 16S ve 18S ribozomal RNA dizileri karşılaştırılması esasına dayanarak günümüzdeki son halini almıştır. Bu yeni bakış açısıyla Woese ve Fox tarafından 1977 yılında canlılar Bacteria, Archaea ve Eukarya olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır ve her bir ana grup “domain” olarak adlandırılmıştır (Woese ve Fox 1977; Woese ve ark. 1990).

1.1. Archaea Domaini

Günümüze kadar yapılan çalışmalardan elde edilen moleküler analizler Archaea domaininin prokaryot yapıda olmalarına rağmen transkripsiyon ve translasyon motiflerinin Bacteria’den çok Eukarya domainine benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Arkeler transkripsiyon sırasında ökaryotlara benzer şekilde TATA bağlama proteinlerini içeren RNA polimeraz II promotorları ve transkripsiyon başlatıcı transkripsiyon faktör II B’yi kullanırlar (Langer ve ark. 1995). Arke translasyonunda başlama ve uzama kısmında görev alan faktörler yine ökaryotlarla benzerlik göstermektedir (Bell ve Jackson 1995).

Arkelerin en dikkat çekici özelliği hücre duvarlarında peptidoglikan içeren bir muramik asit olan murein molekülünü içermemeleridir. Buna rağmen osmotik basınca karşı dirençli hücrelerdir. Bunun yanı sıra hücre yüzeyleri kristalin protein katmanı ile çevrilidir. Arkeleri osmotik basınca karşı koruyan yüzey katman proteinleri (S-layer proteinleri) evrimleşen ilk hücre zarı yapısı olarak düşünülmektedir. İstisnalarla birlikte hemen hemen her arke türü bu tabakaya sahiptir. Bunun yanı sıra çok az arke türünde pseudomurein tabakası mevcuttur. Bu yapı bakteriyal peptidoglikanlarla benzerlik gösterse de peptidoglikanların biyosentezine katılan hiçbir proteinle homoloji göstermemektedir (Albers ve Meyer 2011).

Arkeler ağırlıklı olarak yüksek tuzlulukta ve yüksek sıcaklıktaki karasal ve sucul alanlarda yaşayan ekstrem canlılardır. Bununla birlikte çamurlarda anoksik koşullarda, okyanusların dibinde ve hatta petrol rezervlerinde bile yaşayabilirler (Esko ve ark. 2009). Bunun yanı sıra hayvanların sindirim sisteminde simbiyotik

olarak yaşadıkları da bildirilmiştir (Hara ve ark. 2002). Genellikle anaerobik canlılar olsalar da, aerobik ve fakültatif anaerobik olarak yaşayan türleri de bulunmaktadır (Schleper ve ark. 1996; Segerer ve ark. 1986). Büyük oranda yüksek sıcaklıkta (termofil), yüksek osmotik basınçta (halofil) ve ekstrem pH'lı ortamlarda (asidofil ve alkalofil) yaşamalarına rağmen normal sıcaklık ve tuzluluk oranına sahip habitatlardan izole edilen türleri de mevcuttur (Chaban ve ark. 2006).

Archaea domaini Euryarchaeota, Crenarchaeota (Woese ve ark. 1990) ve Thaumarchaeota (Brochier-Armanet ve ark. 2008) olmak üzere üç filumdan oluşmaktadır. Bunun yanı sıra henüz taksonomik olarak kabul görmemiş olsa da Aigarchaeota, Geoarchaeota, Korarchaeota ve Nanoarchaeota olmak üzere dört farklı filum daha önerilmiştir (Lindås ve Bernander 2013).

1.2. Halofillik

Halofil, 100 g/l'den daha yüksek tuzluluğa sahip alanlarda gelişim gösteren canlılara verilen isimdir. Kushner 1985'te halofilleri gereksinim duydukları tuz konsantrasyonuna göre sınıflandırmıştır. Buna göre gelişmek için %1'den daha az oranda tuza gereksinim duyanlar, halofilik olmayanlar; gelişebilmek için %1-3 arasında tuza ihtiyaç duyanlar, az halofiller; gelişebilmek için %3-5 oranında tuza gereksinim duyanlar, orta derecede halofiller ve gelişebilmek için %15'den daha fazla tuza ihtiyaç duyanlar ise ekstrem halofiller olarak adlandırılmıştır (Kushner, 1985).

Halofilik organizmalar Archaea, Bacteria ve Eukarya domainin üçünde de mevcuttur. Archaea domaini içinde ise sadece Euryarchaeota filumu üyelerinde halofillik görülmektedir (Oren 2008).

1.3. *Haloferax alexandrinus*

Haloferax alexandrinus ilk kez Asker ve Ohta tarafından İskenderiye (Mısır) şehrindeki tuz göllerinden izole edilen ekstrem halofil bir arkedir (Asker ve Ohta 2002a). Euryarchaeota filumunun Halobacteriales ordosuna ait bir türdür (Brenner ve ark. 2001). Ayrıca ülkemizdeki Tuz Gölü'nden de izole edildiği bilinmektedir (Mutlu, 2008).

Haloferax alexandrinus 250 g/l tuz konsantasyonlarında optimum gelişim gösteren ve magnezyum sülfata yüksek derecede bağımlı bir halofildir. Optimum 40 g/l magnezyum sülfata ihtiyaç duyar ancak 409 g/l'ye kadar magnezyum sülfat içeren ortamlarda da yaşayabilmektedir. Zorunlu bir aerobtur. Nitrat ve nitriti anaerobik olarak indirgeyebilirler. Hücreleri suda parçalanır. Gelişmesi için gereken sıcaklık aralığı 20-55°C olmakla birlikte optimum gelişim sıcaklığı 37°C'dir. Bunun yanı sıra 5.5-7.5 pH aralığında gelişim gösterebilir ancak optimum gelişim pH'ı 7.2'dir. Kullandığı karbon kaynakları çok çeşitlidir. Glikoz, gliserol, süksinat gibi basit karbon kaynaklarını kullandıkları gibi aminoasitler, yeast ekstrakt gibi daha karmaşık karbon ve azot kaynaklarını kullanabilirler. Bununla birlikte pepton, kazein ve nişastayı karbon kaynağı olarak kullanamamaktadırlar (Asker ve Ohta 2002b).

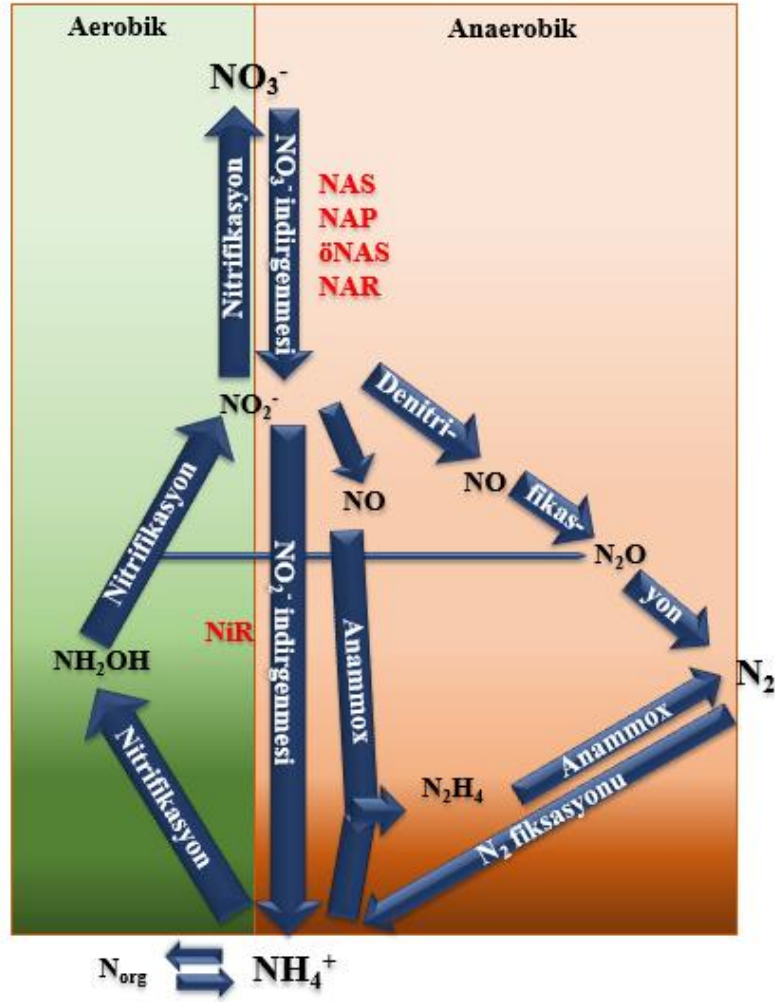
1.4. Azot Döngüsü

Azot (N₂) güneş sistemindeki en çok bulunan beşinci element olup nükleik asitlerin ve proteinlerin yapısında rol aldığı için de tüm canlılar için çok önemlidir (Cabello ve ark. 2004; Canfield ve ark. 2010). Atmosferde yaklaşık olarak %80 oranında gaz formundadır ve diğer kısmı toprakta kayalar, organik maddeler ve minerallerde direkt olarak kullanılmayacak şekilde bulunmaktadır. Bu kaynaklardaki azottan yararlanabilmek için azot döngüsünün bölümleri olan biyolojik azot fiksasyonu, immobilizasyon, amonifikasyon, nitrifikasyon ile nitrat asimilasyonu, disimilasyonu ve denitrifikasyonu gibi olayların gerçekleşmesi gerekir (Canfield ve ark. 2010). Biyolojide azot bileşenleri üretmek için +5 (nitrat) ile -3 (amonyak) aralığındaki yükseltgenme basamaklarına sahip çeşitli redoks reaksiyonları meydana gelir (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a). Bu nitrojen döngüleri ve redoks reaksiyonları farklı organizmalar tarafından farklı yollarla gerçekleştirilir ve tüm bu reaksiyonların toplamı biyolojik azot döngüsünü meydana getirir (Cabello ve ark. 2004).

Azotun biyosferde kullanılabilmesi için biyolojik moleküllere dönüştürülmesi gerekmektedir. Azot fiksasyonu olarak adlandırılan bu dönüşüm prokaryotlar tarafından azot gazının nitrojenaz enzimi ile amonyuma (NH₄⁺) indirgenmesi sayesinde gerçekleştirilir (Şekil 1.1) (Cabello ve ark. 2004).

Ökaryotların da fiksasyon yaptığı bildirilmiş olsa da bu organizmalar azot fiksasyonu yapan prokaryotlarla simbiyotik olarak yaşayan canlılardır. Bazı organizmalar fiksasyon yapmak yerine azotu doğrudan amonyum olarak doğadan alabilirler ya da asimile edici nitrat redüksiyonu yoluyla nitratı (NO_3^-) NH_4^{+} 'e indirgerler. Amonyum ve diğer biyolojik formları doğada tekrar serbest kaldığında kaderleri ortamdaki oksijen varlığına göre belirlenir. Oksijen varlığında, amonyum nitrifikasyon olarak adlandırılan yolak yardımıyla nitrate yükseltgenirken oksijen yokluğunda nitrat iki farklı yolak kullanılarak indirgenir. Bu yollardan birincisi son ürün olarak amonyumun oluştuğu disimile edici nitrat indirgenmesi yolağıdır. İkincisi ve daha yaygın olarak kullanılanı ise nitratın azot gazına indirgendiği denitrifikasyondur (Şekil 1.1) (Canfield ve ark. 2010). Nitrifikasyon ve denitrifikasyon sırasında açığa çıkan nitroz oksit (N_2O) atmosferdeki sera gazı etkisinden sorumlu gazdır (Dore ve ark. 1998).

Anaerobik amonyum oksidasyonu (annomox) çoğu deniz habitatlarında N_2 oluşmasına katkı sağlayan nitritin indirgenmesi ile amonyumun yükseltgenmesinin birlikte çalıştığı ve denitrifikasyonun aksine nitroz oksit üretimine neden olmayan ekzogenik bir süreçtir (Şekil 1.1) (Strous ve ark. 2006).



Şekil 1.1. Azot döngüsünün önemli basamakları. Nitrifikasyon aerobik koşullarda gerçekleşirken NAS aracılığıyla NO_3^- ve NiR aracılığıyla NO_2^- indirgenmesi, anaerobik amonyum yükseltgenmesi (anammox), denitrifikasyon ve N_2 fiksasyonu anaerobik koşullarda gerçekleşmektedir (Canfield ve ark. 2010'dan uyarlanmıştır)

1.4.1. Nitratın nitrite ve amonyuma indirgenmesi

Nitratın amonyuma indirgenmesi iki basamaklı bir yolaktır. Birinci basamakta (1.1)'de görüldüğü gibi nitrat (NO_3^-) nitrite (NO_2^-) indirgenir ve reaksiyon nitrat redüktaz (Nas) enzimi ile iki elektron indirgenerek katalizlenir.



Nitratin nitrite indirgenmesi sırasında farklı organizmalardan izole edilmiş nitrat redüktazlar dört grupta toplanmıştır. Bunlardan birincisi ökaryotlardan izole edilen asimile edici nitrit redüktazlardır (öNAS). Bu öNAS'lar FAD, sitokrom b557 ve molibdenum olmak üzere üç farklı prostetik gruba sahiptirler (Campbell 2001).

Reaksiyonu katalizleyen nitrat redüktazlardan diğer üçü prokaryotlardan izole edilen enzimlerdir. Bunlardan ilki nitrat asimilasyonunda görev alan asimile edici nitrat redüktazlardır (NAS). Bu enzimlerin aktivasyonu asimilasyonun son ürünü olan amonyum tarafından allosterik olarak durdurulur (Moreno-Vivián ve ark. 1999). Ferrodoksin (Fd) veya NAD(P)H'ı elektron vericisi olarak kullanan iki tipi belirlenmiştir. Elektron vericisi olarak ferrodoksini kullanan NAS'ların demir açlığı koşulları altında flavidoksini de elektron verici olarak kullandığı bildirilmiştir (Guerrero ve ark. 1981).

Prokaryotik nitrat redüktazlardan ikincisi nitrat solunumunun ilk basamağını katalizleyen ve merkezi bölgeleri sitoplazmada bulunan nitrat redüktazlardır (NAR) (Zumft, 1997; Blasco ve ark. 2001).

Nitratin nitrite indirgenmesini katalizleyen üçüncü ve son prokaryotik nitrat redüktaz ise hücrenin periplazmasında yer alan asimile edici olmayan nitrat redüktazlardır (NAP) (Berks ve ark. 1995).

Nitratin amonyuma indirgenmesi yolağındaki ikinci basamak ise (1.2)'de görüldüğü şekilde nitritin amonyuma (NH₄⁺) 6 elektron kullanılarak indirgenmesi ile meydana gelmektedir.



Nitritin amonyuma indirgenmesi reaksiyonu asimile edici nitrit redüktazlar tarafından katalizlenir (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a).

Redoks reaksiyonları sitoplazma membranındaki elektron taşıma sisteme ya da sitoplazmik olarak çözünebilen ve genellikle NAD(P)H'ı elektron kaynağı olarak kullanan enzimlere bağımlıdır. "Asimile edici" ve "disimile edici" terimlerinin reaksiyonların elektron kaynağı farkına göre belirlenir. "Asimile edici" terimi hücre materyaline katılan moleküller ve iyonlar oluşturan reaksiyonlar için kullanılır ve asimile edici enzimler elektron alıcısı olarak doğrudan membran elektron taşıma sistemini kullanmazlar. Bunun yanı sıra "disimile edici" terimi ise

elektronlarını membran taşıma sisteminden alır (Moreno-Vivián ve Ferguson 1998). Bu nedenle asimile edici yollar olan azot fiksasyonu ve asimile edici nitrat indirgenmesi sonucu oluşan amonyum glutamat sentaz ve glutamat dehidrojenaz yoluyla karbon iskeletine katılarak aminoasitleri oluşturmada kullanılır (Guerrero ve ark. 1981; Bonete ve ark. 2008).

Asimile edici nitrat indirgenmesinin arkelerde (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a, Kılıç 2010), bakterilerde (Coleman ve ark. 1978), alglerde (Zumft 1972; Ho ve ark. 1976), mayalarda (Rivas ve ark. 1973), mantarlarda (Vega ve Garrett 1975) ve yüksek bitkilerde (Vega ve Kamin 1977) gerçekleştiği bildirilmiştir.

1.4.2. Asimile edici nitrit redüktazlar

Asimile edici nitrit redüktazlar temelde elektron vericisi olarak kullandıkları moleküle göre iki tiptirler. Elektron vericisi olarak feredoksini kullanan asimile edici nitrit redüktazlar tipik olarak fotosentetik organizmalarda tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra NAD(P)H'ı elektron vericisi olarak kullanan nitrit redüktazlar ise fotosentetik olmayan organizmalardan izole edilmiştir (Guerrero ve ark. 1981).

Daha önce yapılan çalışmalarda siyanobakterlerin (Luque ve ark. 1993), deniz algleri ve yüksek bitkilerin feredoksini elektron vericisi olarak kullandığı belirtilmiştir. Bununla birlikte siyanobakterlerin NAD(P)H'tan doğrudan elektron alamadıkları ancak düşük moleküler ağırlıklı bir flavoprotein olan flavodoksini elektron vericisi olarak kullanabildikleri rapor edilmiştir (Zumft 1972; Vega ve Kamin 1977). Bunun yanı sıra yapay elektron vericisi olarak kullanılan moleküller arasında metil viyolojenin en etkili elektron verici olduğu da bilinmektedir (Guerrero ve ark. 1981; Martínez-Espinosa ve ark. 2001a). Feredoksin nitrit redüktazlar çözünebilen enzimler olmasına rağmen *Anacystis sp.*'de (siyanobakter) hücre içi partiküllerle ilişkili gibi görünmektedir. Saflaştırılan FdNiR'lerin hidroksilamini nitrite göre daha düşük bir hızda da olsa amonyuma indirgediği bilinmektedir. Ancak sülfid redüktazlar hem nitriti hem hidroksilamini hem de sülfidi substrat olarak kullanabilseler de FdNiR'lerin sülfidi substrat olarak kullanmadığı görülmüştür (Zumft 1972; Ho ve ark. 1976; Vega ve Kamin 1977).

Yapılan çalışmalar FdNiR'lerin 60-70 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olduğunu ve ~600 aminoasitlik tek bir polipeptit zincirinden oluştuğunu göstermiştir (Guerrero ve ark. 1981)

Siyanobakterlerde siyanürün (Vega ve ark. 1980), yüksek bitkilerde (Hucklesby ve ark. 1976) ve alglerde karbon monoksidin (CO), ve biguanid hidroklorürün (pHMB) FdNiR'leri inhibe ettiği bilinmektedir (Zumft 1972; Vega ve Kamin 1977). Ayrıca *Cucurbita* nitrit redüktazını da mersalille inhibe olduğu gösterilmiştir (Hucklesby ve ark. 1976).

Yüksek bitkilerle ve alglerle yapılan çeşitli çalışmalardan saf olarak elde edilen FdNiR'ler "hem" içeren proteinlerle benzer spektrum göstermektedirler. Bu spektrumların hepsinde 380-390 nm ve 570-580 nm dalga boylarında pikler tespit edilmiştir (Guerrero ve ark. 1981). İspanaktan saflaştırılan nitrit redüktazın hem-prostetik grubu sülfid redüktazdaki prostetik yapıyla benzer olduğu için "sirohem" olarak adlandırılmıştır (Krueger ve Siegel 1982) ve bu prostetik grup üzerine yapılan çalışmalar yüksek bitkilerden izole edilen nitrit redüktazlarda bir demir-sülfür merkezinin olduğunu ve bu merkezin tetranükleer kümeler (4Fe-4S) halinde bulunduğunu göstermiştir (Aparicio ve ark. 1975; Lancaster ve ark. 1979).

Fotosentetik olmayan canlılardan izole edilen asimile edici nitrit redüktazlar indirgenmiş piridin nükleotitlerini elektron vericisi olarak kullanmaktadır (Guerrero ve ark. 1981). Bir fungus olan *Neurospora crassa*'nın hem NADPH'ı hem de NADH'ı (Garrett 1972), bir maya türü olan *Torulopsis nitratophila*'nın sadece NADPH'ı (Rivas ve ark. 1973), *Escherichia coli* (Coleman ve ark. 1978) ve *Azotobacter chroococcum* (Guerrero ve ark. 1973) gibi prokaryot organizmaların ise NADH'ı elektron verici olarak kullandığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu indirgenmiş piridin nükleotitlerine ihtiyaç duyan NiR'ler maksimum aktivite için FAD'a gereksinim duyarlar (Campbell ve Kinghorn 1990).

Neurospora crassa (Garrett, 1972) ve *E. coli* (Coleman ve ark. 1978) NAD(P)H-nitrit redüktazları da hidroksilamini amonyuma indirgemektedir. Ancak bu enzimler sülfidi substrat olarak kullanamazlar (Garrett, 1972; Coleman ve ark. 1978).

Karbon monoksit *Neurospora*'da enzimle bir kompleks oluşturarak asimile edici NAD(P)H-nitrit redüktazların inhibe olmasına neden olur (Vega ve ark. 1973) Ayrıca nitrit benzeri; sülfid, siyanür ve arsenit gibi çeşitli inorganik anyonlar da NAD(P)H-nitrit redüktazları inhibe etmektedir (Coleman ve ark. 1978; Garrett ve Amy 1979). Bunun yanı sıra yapılan tüm NAD(P)H-nitrit redüktaz çalışmalarında *pHMB*'nin enzimi son derece etkin bir biçimde inhibe ettiği gösterilmiştir (Guerrero ve ark. 1981).

NiR'in hücredeki aktivasyonunun düzenlenmesi ökaryotlarda transkripsiyonel düzenlemeye bağlıdır. *Chlamydomonas*'ta amonyum yokluğuna ve ışık varlığına bağlı olduğu gösterilmiştir (Fernández ve ark. 1998).

1.4.2.1. Halofilik asimile edici nitrit redüktazların biyokimyasal özellikleri

Fotosentetik organizmalarda asimile edici nitrit redüktazlar kloroplastta bulunan feredoksini elektron vericisi olarak kullanırken fotosentetik olmayan asimile edici nitrit redüktazlar ise NAD(P)H'ı kullanmaktadır (Campbell ve Kinghorn 1990). İlginç bir şekilde Archaea domaini üyesi, halofil *Haloferax mediterranei*'den asimile edici nitrit redüktaz saflaştırılan ilk ve tek çalışmada Martínez-Espinosa ve ark. (2001a) organizmanın fotosentez yapmadığı halde feredoksin kullandığını bildirmişlerdir.

Feredoksin sıcaklığa oldukça dayanıklı bir proteindir. 0.2 M gibi düşük tuz konsantrasyonlu ortamlara 60°C sıcaklıklara kadar stabil kalabilir. Tuz konsantrasyonu 4 M gibi yüksek konsantrasyonlara ulaştığında feredoksin 80°C sıcaklıklarda bile bozulmadan kalabilmiştir (Bonete ve ark. 2008). Bunun yanı sıra *E. coli*, *Azotobacter* ve funguslarla yapılan çalışmalar NAD(P)H bağımlı asimile edici nitrit redüktazların oldukça dayanıksız olduğunu göstermektedir (Guerrero ve ark. 1981). Bu veriler arkeal NiR'lerin ekstrem ortamlara uyum sağlamak için feredoksin kullandığını düşündürmektedir.

Haloferax mediterranei'den saflaştırılan NiR NADH'ı elektron vericisi olarak kullanamaz. Ancak Martínez-Espinosa ve ark. (2001a) tarafından yapılan çalışmada NiR, NADPH varlığında, %10 enzim aktivitesi göstermiştir.

Halofilik ilk asimile edici nitrit redüktaz enziminin SDS-PAJE analizleri enzimin 66 kDa'lık bir polipeptit zincirinden oluşan monomerik bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. *Haloferax mediterranei* NiR'i için K_m değeri 8.6 mM'dir ve maksimum enzim aktivitesi 60°C'de 3.3 M NaCl'de gözlenmiştir. Saflaştırılan diğer asimile edici nitrit redüktazlarla uyumlu bir şekilde sirohem ve [4Fe-4S] kümeleri içermektedir (Martínez-Espinosa 2001a).

Haloferax mediterranei'de NiR siyanür, fenazin metosülfat (PMS) ve 2,6-diklorofenol indofenol (DPIP) tarafından inhibe edilmiştir. Bunun yanı sıra EDTA, azid ve FAD varlığında enzim aktivitesi yaklaşık yarı yarıya azalmıştır (Martínez-Espinosa 2001a).

Arkeal NiR'ler bakteriyel NiR'lere benzer şekilde nitrit varlığında aktifleşirken amonyum artışıyla birlikte baskılanmaktadır.

1.5. Amaç

Bu tez çalışmasında halofil bir arke olan *Haloferax alexandrinus*'tan asimile edici nitrit redüktazın saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece arkeal nitrat asimilasyonu ile ilgili literatürdeki eksikliğin giderilmesi konusunda önemli adımlar atılmış olacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizma

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma *Haloferax alexandrinus* (JCM 10717) organizmasıdır. Bu organizma ilk kez Asker ve Ohta tarafından 2002 yılında İskenderiye'den (Mısır) izole edilmiştir. Daha önceden Japan Collection of Microorganisms RIKEN BioResource Center'den liyofilize olarak elde edilen kültür bölümümüzün kültür koleksiyonunda mevcut bulunmaktadır.

2.1.2. Çalışmada kullanılan besiyeri

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin içeriği Difco, Fluka, Merck ve Sigma'dan temin edilmiştir.

Konsantre %30 deniz suyu (SW) (gr/l) stok sıvı besiyeri

NaCl.....	240 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	30 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	35 gr
KCl.....	7 gr
1M Tris.Cl, pH 7.5.....	5 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	2 ml

CaCl₂.2H₂O steril olarak hazırlandıktan sonra besiyeri içeriğine eklenmiştir. Tris baz ile pH 7.5'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera ve ark. 1988).

%25 maksimal sıvı besiyeri (gr/l)

Deniz suyu (%30 stok).....	833 ml
Distile su.....	134 ml
Pepton (oxid).....	5 gr
Yeast extract.....	1 gr

Tris.Cl ile pH 7.5'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera ve ark. 1980; Rodríguez-Valera ve ark. 1983).

Minimal sıvı besiyeri (gr/l)

NaCl.....	250 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	20 gr
KCl.....	2 gr
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	3 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.05 gr
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0.2 mg
Glikoz.....	5 gr
KNO ₃	10 gr
KH ₂ PO ₄	0.5 gr
FeCl ₃	0.02 gr

Tüm kimyasal maddeler çözdürüldükten sonra NaOH kullanılarak pH 7.4'e ayarlanıp distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

2.1.3. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

Çalışmada kullanılan solüsyonlar Fluka, Merck ve Sigma tarafından temin edilmiştir.

2,5 M amonyum sülfat tamponu (gr/l)

(NH ₄) ₂ SO ₄	330.35 gr
NaH ₂ PO ₄	4.05 gr
Na ₂ HPO ₄	4.63 gr

pH 7.4 ayarlanmış ve distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Hücre yıkama tamponu (gr/l)

NaCl.....	250 gr
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	3 gr
KCl.....	2 gr

Distile su kullanılarak 1 litreye tamamlanmıştır.

4.26 M Sodyum klorür (50 mM fosfat tamponu içinde)

NaCl.....	250 gr
NaH ₂ PO ₄	4.05 gr
Na ₂ HPO ₄	4.63 gr

pH 7.3'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

700 mM metil viyolojen (MV)

Metil viyolojen.....	1.80 gr
Distile su.....	10 ml

Hazırlandıktan sonra koyu renkli bir şişede ve 4°C'de 1 aya kadar saklanmıştır.

500 mM potasyum nitrit (KNO₃)

KNO ₃	4.255 gr
Distile su.....	100 ml

1 M sodyum dihidrojen fosfat

NaH ₂ PO ₄	69 gr
Distile su.....	500 ml

1 M disodyum hidrojen fosfat

Na ₂ HPO ₄	71 gr
Distile su.....	500 ml

1 M fosfat tamponu (pH 7.5)

1 M NaH₂PO₄.....80 ml

1 M Na₂HPO₄.....20 ml

340 mM sodyum ditiyonit (Na₂S₂O₄) [0.1 M sodyum bikarbonat (NaHCO₃) içinde]

NaHCO₃.....0.84 gr

Na₂S₂O₄.....0.591 gr

Distile su.....10 ml

Her kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır.

%1'lik sülfanilamid

3 N hidroklorik asit.....100 ml

Sülfanilamid.....1 gr

N-(1-naftil)-etilendiamin-dihidroklorür (NEDA)

NEDA.....0.02 gr

Distile su.....100 ml

1.5 M Tris baz (pH 8.8)

Tris baz.....181.65 gr

800 ml distile su eklenerek Tris baz çözülmüştür. HCl kullanılarak pH 8.8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Whatman No:1 filtre kâğıdı kullanılarak filtre edildikten sonra koyu renkli şişede saklanmıştır.

1 M Tris baz (pH 6.8)

Tris baz.....121.1 gr

800 ml distile su eklenerek Tris baz çözülmüştür. HCl kullanılarak pH 6.8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Whatman No:1 filtre kâğıdı kullanılarak filtre edildikten sonra koyu renkli şişede saklanmıştır.

10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) stok

SDS.....10 gr

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kâğıdı ile filtre edilmiştir.

%10'luk amonyum persülfat

Amonyum persülfat.....100 mg

Distile su ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Her kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır.

SDS elektroforez tamponu

Tris baz.....30.3 gr

Glisin.....144.2 gr

SDS.....10 gr

Tris baz ve glisin distile su içinde çözüldükten sonra SDS ilave edilmiştir. SDS de çözdürüldükten sonra distile su kullanılarak 1 litreye tamamlanmıştır.

Protein yükleme tamponu

Gliserol.....0.8 ml

%10 SDS.....1.6 ml

β -merkapto etanol.....0.4 ml

1 M Tris baz (pH 6.8).....0.5 ml

%0.05 Bromfenol mavisi.....0.2 ml

Distile su.....4.5 ml

Standart protein karışımı

Elektroforez için standart protein karışımı BioRad'dan (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Standards Kat. No: 161-0375) temin edilmiştir. Bu standart protein 10000 ile 250000 Dalton arasındaki proteinleri içermektedir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Liyofilize kültürün maksimal ve minimal besiyerinde geliştirilmesi

Hazırlanan her bir 250 ml'lik maksimal besiyerine bir vial liyofilize haldeki kültürden eklenmiştir. Besiyerleri 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Ortalama inkübasyon süresi 12 gündür. Kültürler geliştikten sonra 4°C'de saklanmıştır.

Hazırlanacak 500 ml'lik minimal besiyeri için maksimal besiyerinden 5 ml'lik örnek alınmıştır. Bu örnekler tüplere aktararak 8000×g'de 5 dakika kadar santrifüj (Beckman Coulter Allegra™ 25R Centrifuge) edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır ve her tüpe 5 ml hücre yıama tamponu eklenmiştir. Tüpler 8000×g'de 5 dakika kadar santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır ve hücreler besiyerlerine eklenmiştir.

2.2.2. *Haloferax alexandrinus*'un potasyum nitrit varlığındaki büyüme eğrisinin çıkartılması

Minimal besiyerlerinden ekim yapıldığı andan itibaren belirli zaman aralıklarıyla 1000 µl'lik örnekler alınmıştır. Bu örnekler spektrofotometrede (Shimadzu UV-2101PC) 600 nm absorbansta ölçülmüştür.

2.2.3. Nitrit redüktaz aktivitesinin en yüksek olduğu üreme fazının belirlenmesi

Sıvı minimal besiyerindeki hücrelerden belirli zaman aralıklarında 100 ml örnek alınarak protein ekstaksiyonu hazırlanmıştır ve elde edilen ham ekstratlerden enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

2.2.4. Enzim ekstraksiyonunun hazırlanması

Minimal besiyerinde büyütülen hücrelerden belirli zaman aralıklarında alınan 100 ml'lik örnekler temiz tüplere aktarılmıştır. 15000×g'de 30 dakika boyunca santrifüj edilerek toplanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüplere 100 ml hücre yıkama tamponu ilave edilmiştir ve tüpler tekrar 15000×g'de 15 dakika kadar santrifüj edilmiştir.

Hücrelerin yıkanmasından sonra her 100 ml'lik örneğe 5 ml olacak şekilde 50 mM sodyum fosfat tamponu içinde amonyum sülfat ilave edilerek hücreler tüplerden kaldırılmış ve temiz tüplere aktarılmıştır. Daha sonra hücreler ultrasonikatör (Sonics and Material Vibra Cell VCX 400) yardımıyla 4°C'de 3'er dakikalık periyotlar halinde 8 kez olacak şekilde parçalanmıştır. Parçalanan hücreler 106000×g'de 60 dakika kadar santrifüj edilmiştir ve elde edilen süpernatant temiz tüplere aktarılmıştır ve deneylerde kullanılmak üzere 4°C'de saklanmıştır.

2.2.5. Nitrit redüktaz (NiR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

NiR aktivite tayini nitritin kolorimetrik olarak belirlenmesi yöntemiyle yapılmıştır. 250 µl hacimli deney karışımı 50 mM fosfat tamponu (pH 7.5), 3.2 M NaCl, elektron vericisi olarak 7 mM metil viyolojen, substrat olarak 5 mM KNO₂, kofaktör ve reaksiyon başlatıcı olarak 17 mM Na₂S₂O₄ (DT) ve 50 µl enzim ekstraksiyonu içermektedir.

Reaksiyon karışımı DT dışında yukarıdaki gibi hazırlandıktan sonra 60°C'de 2 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra deney karışımına 17 mM DT eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Tüpler 60°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildikten sonra tüpler hızlıca sallanarak DT'nin oksidasyonu sağlanmıştır ve reaksiyon bitirilmiştir (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a).

Reaksiyon karışımı temiz bir tüpte 1:40 oranında distile su ile dilüe edildikten sonra tüpe sırasıyla 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NEDA eklenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra enzim aktivitesi spektrofotometrede 540 nm absorbansta saptanmıştır (Snell ve Snell 1949).

2.2.6. Nitrit redüktaz enziminin saflaştırılması

2.2.6.1. Ham ekstraktın hazırlanması

Minimal besiyerinde büyütülen hücreler $15000\times g$ 'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımdaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra tüplere hücre yıkama tamponu ilave edilmiştir ve tüpler tekrar $15000\times g$ 'de 15 dakika kadar santrifüj edilerek yıkanmıştır. Tüplere 50 mM sodyum fosfat tamponu içinde amonyum sülfat ilave edilerek hücreler kaldırılmış ve temiz tüplere aktarılmıştır. Daha sonra hücreler ultrasonikatör yardımıyla $4^{\circ}C$ 'de 3'er dakikalık periyotlar halinde 8 kez olacak şekilde parçalanmıştır. Parçalanan hücreler $106000\times g$ 'de 60 dakika kadar santrifüj edilmiştir ve elde edilen süpernatant temiz tüplere aktarılmıştır ve saflaştırma deneylerinde kullanılmak üzere $4^{\circ}C$ 'de saklanmıştır (Kılıç 2010).

2.2.6.2. Sefaroz 4B kolonunun hazırlanması

Jel filtrasyon kromatografisi makromoleküllerin moleküler büyüklüklerine göre ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir ve Sefaroz 4B kolonu jel filtrasyonunda kullanılan bir kromatografi dolgu maddesidir. Bu kolon 70×10^3 ile 20×10^6 Dalton büyüklükteki moleküllerin ayrımında kullanılmaktadır. Bu dolgu maddesi belirli boyutlardaki gözeneklere sahip olan küresel yapılı, jel halindeki taneciklerden oluşmaktadır. Homojen boyutlarda moleküller içermeyen bir sıvı çözelti kolondan geçirildiğinde gözeneklerden daha büyük olan moleküller gözeneklerde tutulmayıp hızlıca kolonu terk ederler. Daha küçük boyuttaki moleküller ise gözeneklere difüze olurlar ve kolondan geçme süreleri bu alıkonma nedeniyle uzar (Kazan 1997).

Kolon dolgu maddesi distile su ile iyice yıkanarak 2.5×30 cm boyutlarındaki kolona aktarılmıştır. Daha sonra 300 ml 2.5 M $(NH_4)_2SO_4$ içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) kolondan geçirilerek kolon dengelenmiştir. Daha sonra protein ekstraktı kolona aktarılmıştır ve bu ekstrakt 48 ml/saat hızında kolondan geçirilmiştir. Ekstrakt geçirildikten hemen sonra, aynı hızda geçmek şartıyla 100 ml 2.5 M $(NH_4)_2SO_4$ içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) kolona eklenerek kolon yıkanmıştır. Bu işlemin ardından 2.5 M – 0.5 M $(NH_4)_2SO_4$ içeren

50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) toplam hacmi 1 litre olacak şekilde azalan bir akış oluşturarak kolondan aynı hızda geçirilmiştir. Protein örnekleri fraksiyon toplayıcısı (GE Frac-920) yardımıyla her tüpte 8 ml olacak şekilde tüplere toplanmıştır. Proteinler 280 nm absorbansta ölçülmüştür ve elde edilen değerlerde ortaya çıkan en yüksek değerlerin üçer adet önünden ve arkasından alınan örnekler toplanarak enzim aktivitelerine bakılmıştır (Kılıç 2010).

2.2.6.3. Dietyl amino etil (DEAE) selüloz kolonunun hazırlanması

İyon değişim kromatografisi molekülleri sahip oldukları yüklere göre ayırmada kullanılan bir yöntemdir. DEAE selüloz kolonu da bir iyon değişim kromatografisi dolgu maddesidir ve moleküllerin asidik veya bazik özelliklerine göre ayrılmalarında kullanılan bir maddedir. DEAE selüloz maddesi pH 7'de pozitif yüklü olan selüloz türevidir. Kolondan geçirilen maddelerden negatif yüklü olanlar bu dolgu maddesine tutunurken pozitif yüklü moleküller kolonu hızla terk eder. Daha sonra kolonda kullanılan tamponların iyonik kuvveti değiştirilir ve kolon maddesine bağlanmış haldeki negatif yüklü moleküller serbest hale geçerek kolonu terk etmeye başlar. İyon değişim kromatografisinde kullanılan bu tip kolon maddeleri özellikle moleküler ağırlıkları birbirine çok yakın olan molekülleri ayırmada elverişli maddelerdir (Cutler 2004).

1×6 cm boyutlarındaki kolona DEAE selüloz kolonu aktarılmıştır. Kolona aktarılan kolon dolgu maddesinin hacminin iki katı kadar hacimde 2.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) kolona eklenerek kolon dengeli bir hale getirilmiştir. Bu işlemden sonra protein ekstraktı kolona eklenmiştir ve 30 ml/saat hızında kolondan geçirilmiştir. Aynı hızda 2.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) geçirilerek kolon yıkanmıştır. Daha sonra yine aynı hızda kolondan geçirilen 4.26 M NaCl içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) kullanılarak protein ekstraktı tüplere toplanmıştır. Fraksiyon toplayıcısı yardımıyla toplanan proteinler her bir tüpte 2 ml olacak şekilde toplanmıştır (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a).

Proteinler 280 nm absorbansta ölçülmüştür ve elde edilen değerlerde ortaya çıkan en yüksek değerlerin üçer adet önünden ve arkasından alınan örnekler toplanarak enzim aktivitelerine bakılmıştır.

2.2.6.4. Q-Sefaroz kolonunun hazırlanması

Q-Sefaroz kolonu iyon değişim kromatografisinde kullanılan bir kolon dolgu maddesidir.

4×10 cm boyutlarındaki kolona güçlü anyon değiştirici Q-Sefaroz dolgu maddesi aktarılmıştır. Nitrit redüktaz aktivitesi içeren tüpler toplanarak bir gece boyunca 4°C’de %20 gliserol içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0) karşısında diyaliz edilmiştir. Yine aynı tampon kullanılarak kolon dengeli hale getirilmiştir. Daha sonra proteinler kolona eklenmiştir ve kolon dolgu maddesi hacminin iki kadar hacimde aynı tampon kullanılarak kolon yıkanmıştır. Daha sonra gradient oluşturmak için 0 ile 2.5 M arasında NaCl konsantrasyonu içeren %20 gliserollü 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0) eklenmiştir ve proteinler fraksiyon toplayıcı yardımıyla toplanmıştır. Daha sonra proteinlerin 280 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Oluşan piklerin önünde ve ardındaki üç tüp toplanarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür (Martínez-Espinosa 2001a).

2.2.7. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Enzim ekstraksiyonundan ve saflaştırma basamaklarından elde edilen protein örneklerinin içerdiği protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Standart olarak bovin serum albümin kullanılmıştır ve örnekler 595 nm’de ölçülmüştür (Bradford 1976).

2.2.8. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAJE)

Elde edilen protein örneklerinin moleküler ağırlıklarını belirlemek için %12’lik poliakrilamid jel konsantrasyonu kullanılarak SDS-PAJE yönteminden yararlanılmıştır (Laemmli 1970). Moleküler ağırlıkları karşılaştırmak için kullanılan standart protein karışımı BioRad’dan (161-0375) temin edilmiştir ve bu standart 10000 – 250.000 Dalton aralığındaki proteinleri içermektedir.

Elektroforeze (Bio-Rad Mini Protean II Cell) yüklenen proteinler 90 Volt'luk akım altında 2 saat boyunca yürütülmüştür. Daha sonra elde edilen jel Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyanmış ve fazla boyanın uzaklaştırılması için distile su ile yıkanmıştır. Jel görüntüleme sistemi (Uvi-Tec) kullanılarak proteinler analiz edilmiştir.

2.2.9. *Haloferax alexandrinus*'tan elde edilen NiR'in biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

2.2.9.1. NiR enzim aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığının etkisinin belirlenmesi

0.5 M başlangıç konsantrasyonu olmak üzere 1.0, 2.0 ve 3.0 M NaCl konsantrasyonları içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler temiz tüplerdeki NiR enzim reaksiyon karışımı üzerine eklenerek enzimin aktivasyonundaki değişimler incelenmiştir.

NiR enzim aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için 20°C'den başlayarak 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C'lerde NiR enzim aktivitesindeki değişimlere bakılmış ve inkübasyon sıcaklığının aktivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

2.2.9.2. NiR aktivitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi

Enzimin optimum pH'sını belirlemek için daha önce belirlenen optimum sıcaklıkta pH değerleri 5.0 ile 10.0 arasında kademeli olarak değiştirilerek NiR aktivitesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

2.2.9.3. NiR enzim aktivitesi üzerine KCl ve MgCl₂ gibi farklı tuzların etkisinin belirlenmesi

NiR aktivitesi üzerine KCl ve MgCl₂ tuzlarının etkisini belirlemek için bu tuzların 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 M'lık konsantrasyonlarını içeren çözeltiler hazırlanmıştır ve bu konsantrasyonlardaki tuzların varlığında NiR'in enzim aktivitesindeki değişiklikler incelenerek NaCl ile karşılaştırılmıştır.

2.2.9.4. NiR enzim aktivitesi üzerine siyanürün etkisinin belirlenmesi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda sodyum siyanür içeren hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek siyanürün enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.9.5. NiR enzim aktivitesi üzerine etilendiamin tetraasetik asidin (EDTA) etkisinin belirlenmesi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda EDTA içeren hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.9.6. NiR enzim aktivitesi üzerine ditiotreitol (DTT) etkisinin belirlenmesi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda DTT içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek DTT'nin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.9.7. NiR enzim aktivitesi üzerine azidin etkisinin belirlenmesi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda sodyum azid içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek azidin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.9.8. NiR enzim aktivitesi üzerine kloratın etkisinin belirlenmesi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda potasyum klorat içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek kloratın enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

2.2.9.9. NiR enzim aktivitesi üzerine sülfitin etkisinin belirlenmesi

Sodyum sülfid içeren 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek sülfidin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

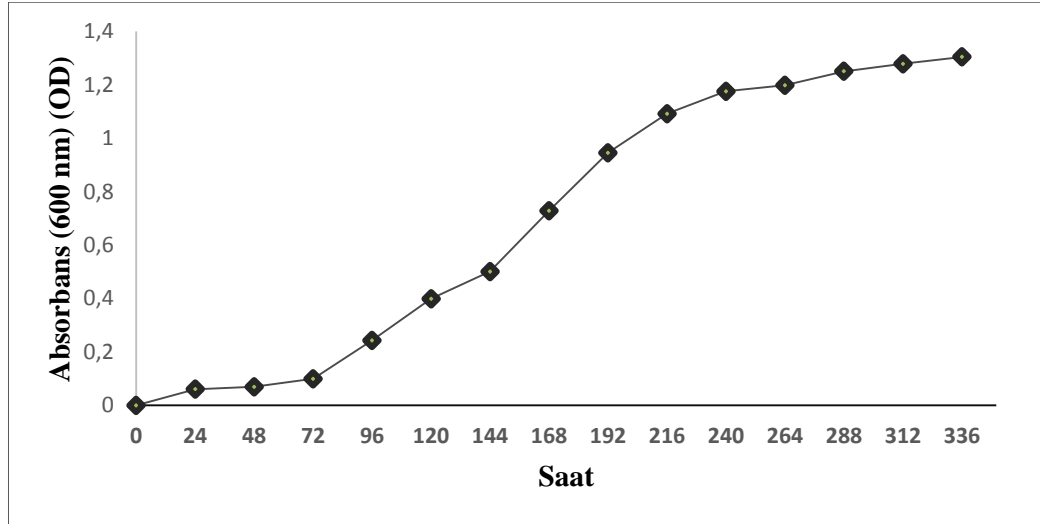
2.2.10. NiR kinetik aktivitesinin analiz edilmesi

Haloferax alexandrinus NiR'inin KNO_2 ve MV için V_{max} ve K_m değerlerin belirlemek için enzim hızının farklı konsantrasyonlardaki substratlara karşı değişimi ölçülmüş ve sonuçlar Lineweaver-Burke grafiğinde gösterilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *Haloferax alexandrinus*'un Potasyum Nitrit Varlığındaki Büyüme Eğrisinin Çıkartılması

Potasyum nitrit içeren minimal besiyerlerinde büyütülen hücrelerden 15 gün boyunca her gün örnek alınarak spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapılmıştır. Hücrelerin büyümelerinde zaman bağlı bir artış gözlenmiştir. 216. saatten sonra hücre büyümesi hızında bir yavaşlama gözlenmiştir. Hücre yoğunluğu 1,30'a kadar ölçülmüştür (Şekil 3.1).

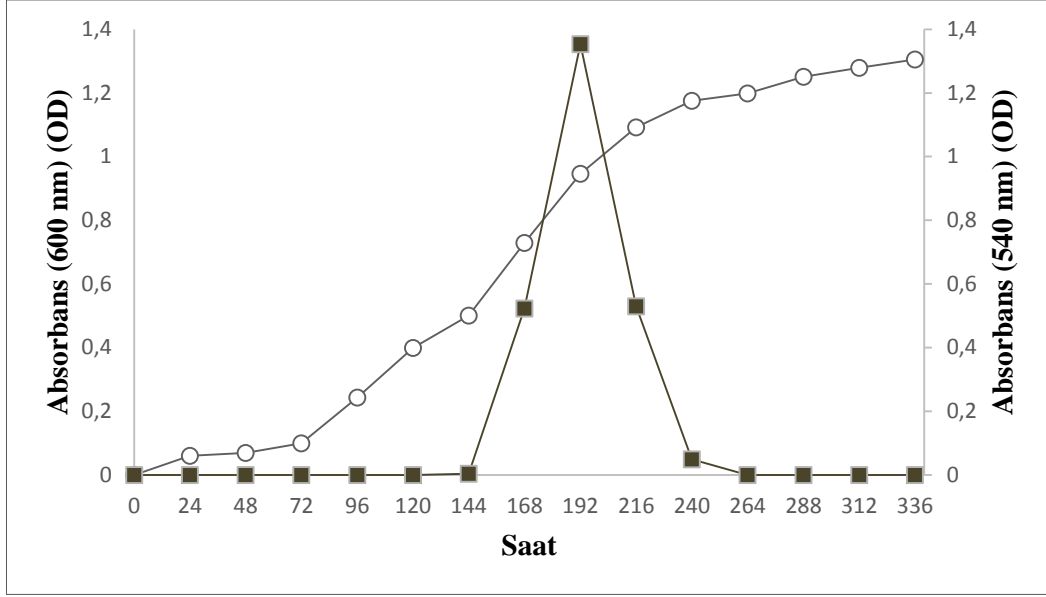


Şekil 3.1. Minimal besiyerinde büyütülen hücrelerin zamana bağlı olarak gelişimi

3.2. NiR Enzim Aktivitesinin Maksimum Olduğu Büyüme Fazının Belirlenmesi

Asimile edici nitrit redüktaz aktivitesinin maksimum olduğu üreme fazını belirlemek 10 gün boyunca besiyerlerinden örnekler alınarak hem büyüme eğrisi oluşturulmuş hem de enzim aktivitesinin hangi fazda en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesi 168. saatlerden itibaren 240. saatlere kadar

mevcuttur. Ancak en yüksek enzim aktivitesinin görüldüğü zaman dilimi 192. saat olarak bulunmuştur. Bu faz 0,946 OD (600 nm) olarak belirlenmiştir. Tüm deneylerin sürdürülebilmesi için gerekli hücre büyümesi bu fazda ya da yakın değerlere kadar gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. NiR aktivitesinin hücrelerin büyümesi sırasında gelişimi enzim aktivitesi ■ (abs)]
[hücre büyüme eğrisi ○ (abs)]

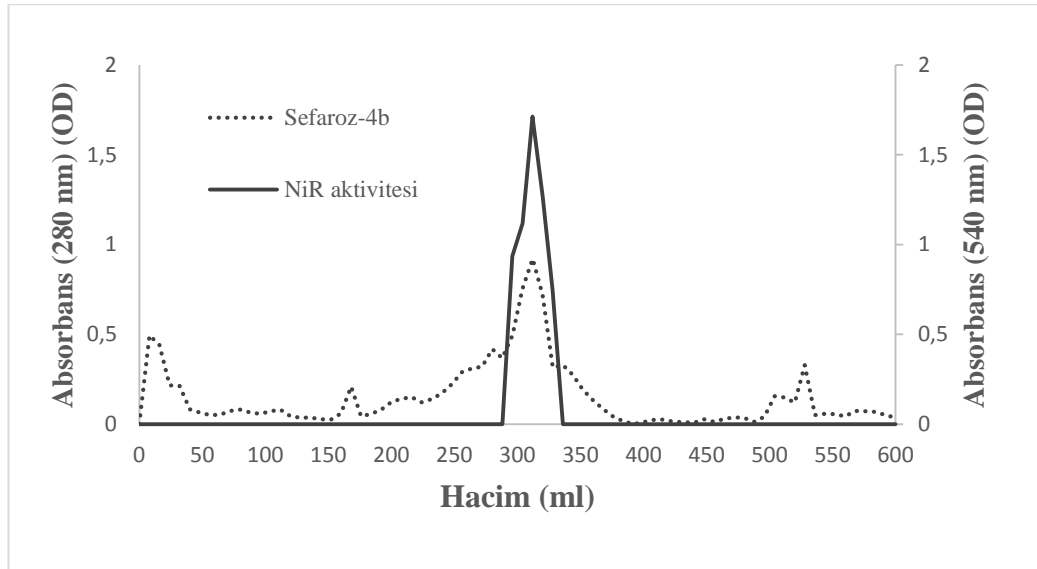
3.3. Saflaştırma

3.3.1. Sefaroz 4B kolonu

2.5×30 cm boyutlarındaki Sefaroz 4B kolonu hazırlanmıştır. Kolondan 2.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tampon pH (7.3) geçirilerek kolon dengelenmiştir. Kolondan 30 ml örnek 48 ml/saat hızında geçirilmiştir. Örnek geçirildikten sonra aynı hızda 100 ml, 2.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tampon geçirilerek yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından toplam hacmi 1 litre

olan 2.5 M-0.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tamponu azalan bir gradient oluşturacak şekilde kolondan geçirilmiştir.

Her fraksiyon için 280 nm’de protein absorbansı ölçülmüş ve 16. ml, 312. ml, 584. ml’lere denk gelen tüplerden yüksek protein absorbansı ölçülmüştür. En yüksek absorbans değerlerine sahip tüplerin önünden ve arkasından alınan üçer adet tüpte yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinde 296 ile 328. ml arasındaki fraksiyonları içeren tüplerde enzim aktivitesi saptanmıştır. Toplanan enzim fraksiyonu 32 ml’dir (Şekil 3.3). Diğer pik oluşturan tüplerde ise enzim aktivitesi saptanamamıştır. Bu toplanan enzim fraksiyonu daha sonra DEAE-selüloz kolonuna aktarılmıştır.



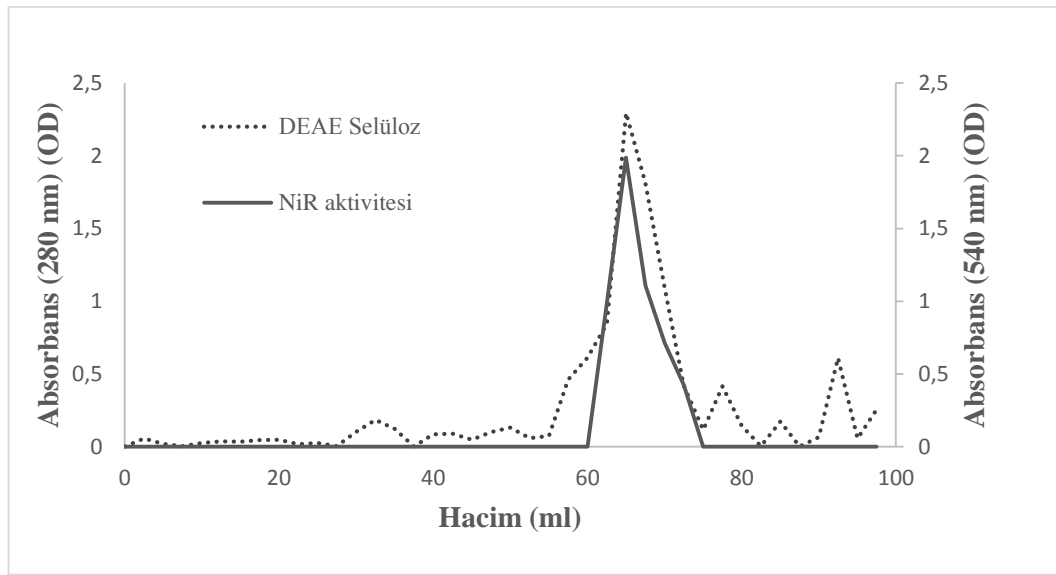
Şekil 3.3. Sefaroz-4B kromatogramı

3.3.2. DEAE-Selüloz kolonu

1x6 cm boyutlarındaki kolon hazırlandıktan sonra, kolonun içindeki dolgu maddesi hacminin iki katı kadar 2.5 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) kolondan geçirilerek kolon dengelenmiştir. Daha sonra 32 ml örnek yüklenerek aynı tampon kullanılarak yıkanmıştır. Enzim 30 ml/sa akış hızı ile 4.26

M NaCl içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.3) ile toplanmıştır. Her tüpte 2.5 ml olacak şekilde fraksiyonlar toplanmıştır.

Her fraksiyon için 280 nm’de absorbans ölçümü işlemi yapılmıştır. Bir sonraki pik ise 57,5 ml ile 72,5 ml arasındaki tüplerde 280 nm’de maksimum protein absorbansı gözlenmiştir. NiR enzim aktivitesi ise 62,5 ml ile 72,5 ml’lik fraksiyonları içeren tüplerden elde edilmiştir. Toplam 10 ml NiR enzimi içeren fraksiyon toplanmıştır. Elde edilen toplam enzim fraksiyonu Q-Sefaroz kolonuna aktarılmıştır (Şekil 3.4.).

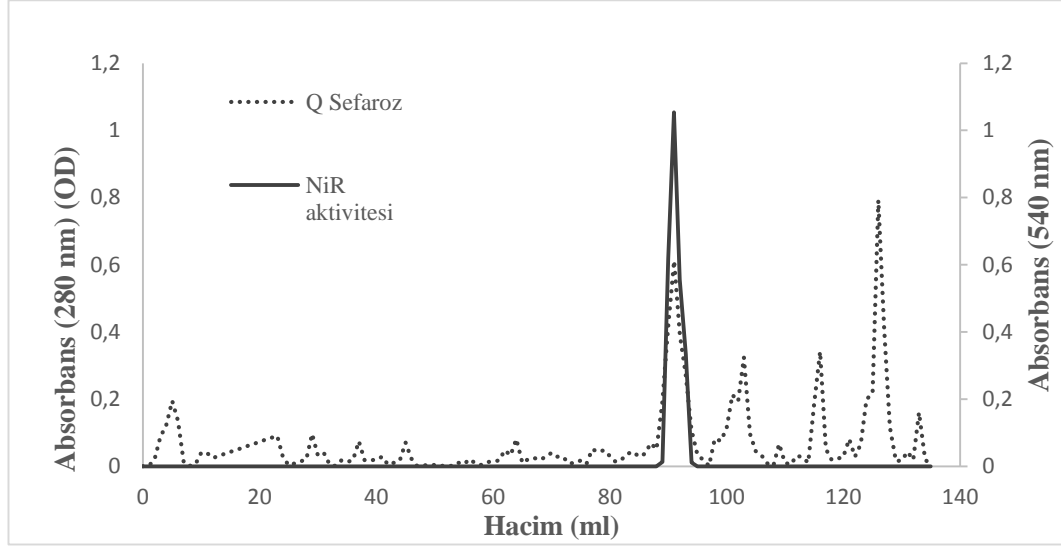


Şekil 3.4. DEAE-Selüloz kromatogramı

3.3.3. Q-Sefaroz kolonu

4×10 cm boyutlarındaki kolona Q-Sefaroz dolgu maddesi aktarılmıştır. 10 ml örnek bir gece boyunca 4°C’de %20 gliserol içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0) karşısında diyaliz edilmiştir. Kolon dengeli hale getirildikten sonra proteinler kolona eklenmiştir ve kolon yıkanmıştır. Gradient oluşturmak için tamponlar kolondan geçirildikten sonra proteinler fraksiyon toplayıcı yardımıyla toplanmıştır. Elde edilen piklerin 280 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Oluşan piklerin önünde ve ardındaki üç tüp toplanarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Pikler 91., 103., 116. ve 126. ml'leri içeren fraksiyonlarda meydana gelmiştir. Bu piklerden 90 ile 93. ml'leri içeren fraksiyonlarda 540 nm'de enzim aktivitesi saptanmıştır (Şekil 3.5). Elde edilen 2.5 ml enzim SDS-PAJE, biyokimyasal karakterizasyon ve K_m , V_{max} değerlerinin belirlenmesi için yapılan deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Q-Sefaroz kromatogramı

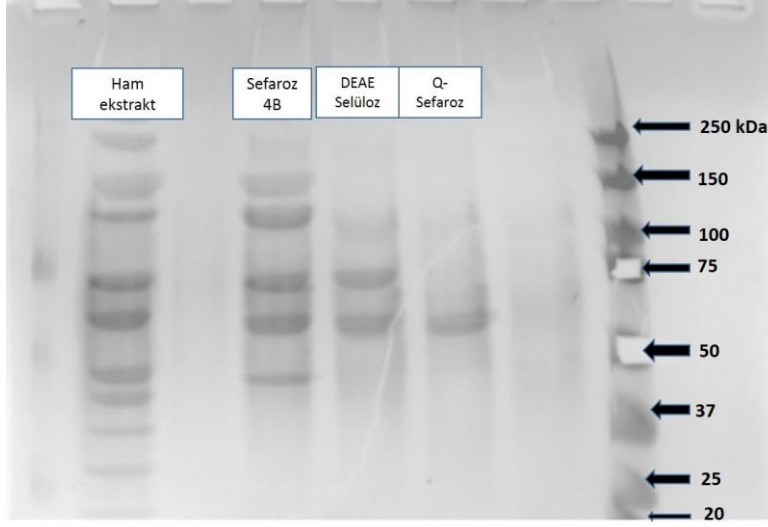
Saflaştırma basamakları sonucunda nitrit redüktaz enzimi 34, 5 kat saf bir halde elde edilmiştir. Elde edilen enzimin spesifik aktivitesi 13,47 U/mg proteindir ve protein miktarı 0,17 mg/ml'dir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Enzim saflaştırma basamakları

Adım	Hacim (ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	İyileştirme (%)	Saflaştırma Derecesi
Ham ekstrakt	30	8,65	101,2	0,39	100	1
Sefaroz 4B	32	1,15	93,1	2,53	91,99	6,48
DEAE Selüloz	10	1,06	40,39	3,81	39,91	9,76
Q-Sefaroz	2,5	0,17	5,72	13,47	5,65	34,5

3.4. NiR'in SDS-PAJE Analizi ve Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

NiR'in moleküler ağırlığını belirlemek için SDS-PAJE yönteminden yararlanılmıştır. %12'lik jel konsantrasyonu kullanılarak proteinlerin ayrılmaları sağlanmıştır. Enzimin molekül ağırlığını karşılaştırmak için 6500 ile 205.000 Dalton arasında moleküler ağırlığa sahip proteinler içeren standart protein karışımı (Sigma S8445) kullanılmıştır. Saflaştırma basamaklarının her birinin ardından elde edilen fraksiyon örneklerinden jel tankına proteinler yüklenmiştir. Kromatografik yöntemlerin sonunda tek bir bant elde edilmiştir. *Haloferax alexandrinus* NiR enziminin moleküler ağırlığı 62 ± 1.8 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6).



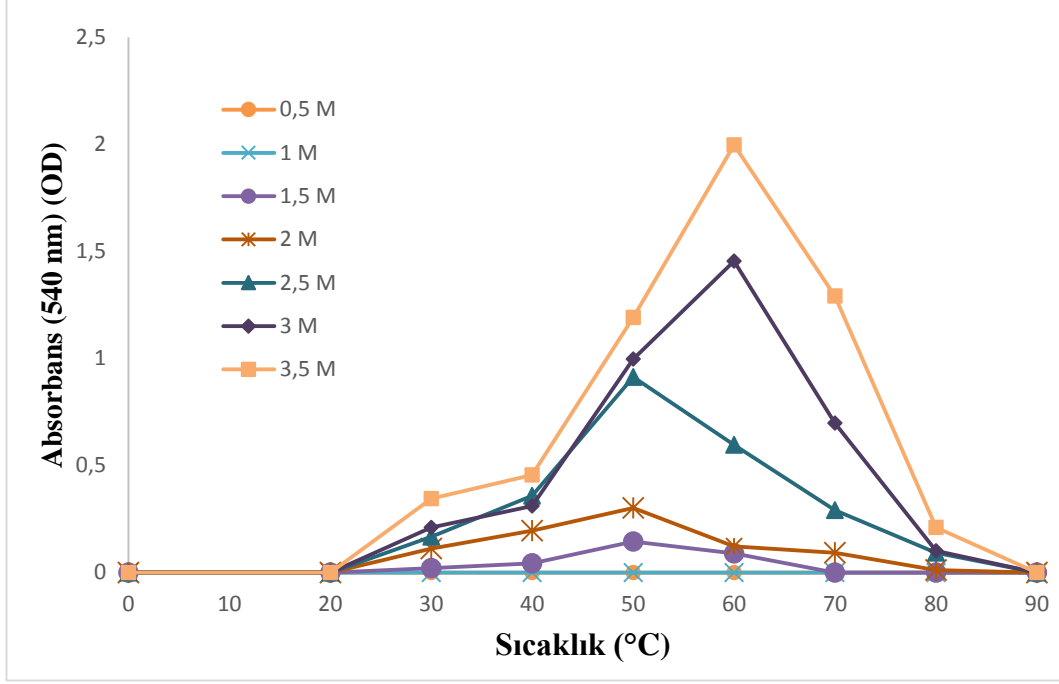
Şekil 3.6. NiR enziminin SDS-PAJE görüntüsü

3.5. *Haloferax alexandrinus*'tan Elde Edilen NiR'in Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.5.1. NiR enzim aktivitesi üzerine NaCl konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığının etkisinin belirlenmesi

Haloferax alexandrinus'tan saflaştırılan NiR enziminin aktivasyonu üzerine NaCl'nin ve inkübasyon sıcaklıklarının bağımlı etkileri araştırılmıştır. 0.5 ile 4.0 M arasındaki NaCl konsantrasyonları reaksiyon karışımına eklenerek 20 ile 90°C arasındaki sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır.

0.5 ve 1.0 M NaCl konsantrasyonlarında hiçbir şekilde aktivite görülmezken enzim 3.5 M NaCl konsantrasyonunda maksimum aktivite göstermiştir. Bununla birlikte 1.5 M, 2 M ve 2.5 M tuz konsantrasyonlarında 50°C'de maksimum aktivite gözlenirken 3 M ve 3.5 M tuz konsantrasyonu içeren ortamlarda 60°C'de maksimum enzim aktivitesi gözlenmiştir. 60°C'den daha yüksek sıcaklıklarda ise aktivite düşmüş ve 80°C'nin üzerinde aktivite saptanamamıştır (Şekil 3.7).

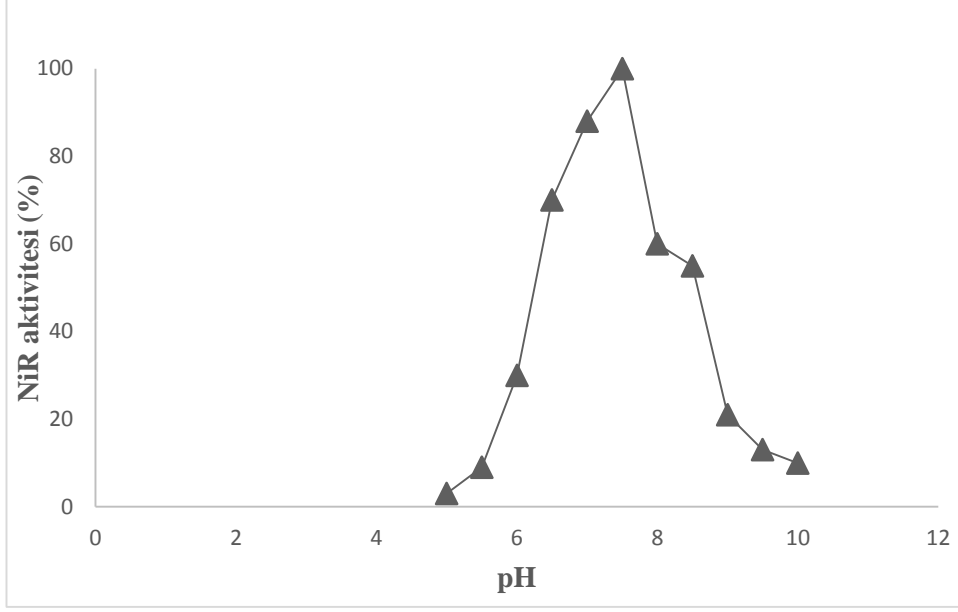


Şekil 3.7. NiR enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın ve inkübasyonun etkisi

3.5.2. NiR enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

Bu çalışmada NiR enziminin 60°C'de maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yine bu sıcaklıkta 5 ile 10 arasındaki pH'larda enzimin aktivitesi ölçülmüştür.

NiR enziminin pH 7.5'ta maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak enzimin pH 7.5'tan daha alkali ortamlarda hızlı bir şekilde aktivitesini yitirdiği gözlenmiştir (Şekil 3.8).

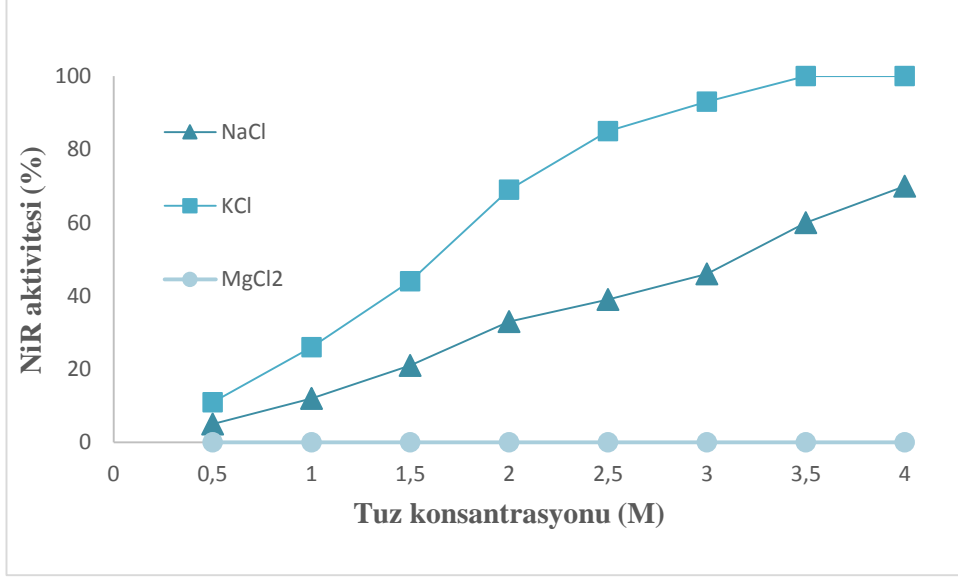


Şekil 3.8. pH'ın NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.5.3. NiR enzim aktivitesi üzerine KCl ve MgCl₂ gibi farklı tuzların etkisi

NiR enzim aktivitesi üzerinde KCl ve MgCl₂ tuzlarının 0.5 ile 4 M arasındaki konsantrasyonlarının etkisine bakılmıştır ve sonuçlar yüzde olarak NaCl ile karşılaştırılmıştır.

Elde edilen verilere göre KCl'nin her konsantrasyonunun NaCl'nin eşdeğer konsantrasyonlarıyla karşılaştırıldığında NiR enzim aktivitesini iki katına çıkartmıştır. Bununla birlikte MgCl₂'nin hiçbir konsantrasyonu enzimi aktifleştirmekte başarılı olamamıştır. Sonuçlar yüzde (%) cinsinden gösterilmiştir (Şekil 3.9).

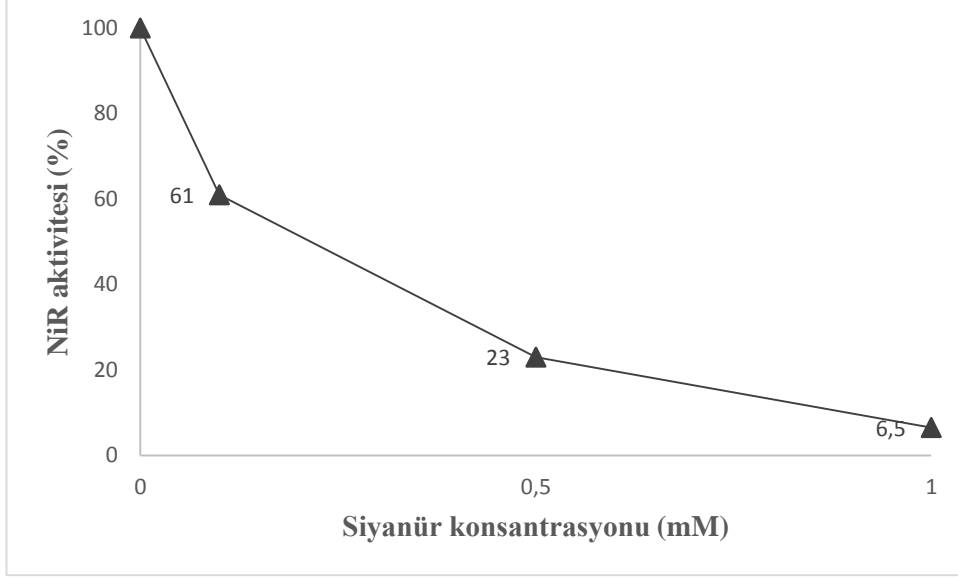


Şekil 3.9. Çeşitli tuzların farklı konsantrasyonlarının NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.5.4. NiR enzim aktivitesi üzerine siyanürün etkisi

0,1, 0,5 ve 1,0 mM'lık konsantrasyonlarda sodyum siyanür içeren hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek siyanürün enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular siyanürün konsantrasyon artışına bağlı olarak enzim aktivasyonunu düşürdüğünü, 1 mM sodyum siyanürün enzim aktivitesini neredeyse tamamen inhibe ettiğini göstermiştir. 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM siyanür içeren reaksiyon karışımlarındaki NiR enzim aktivitesi kaybı sırasıyla %39, %77 ve %93,5'tur (Şekil 3.10).

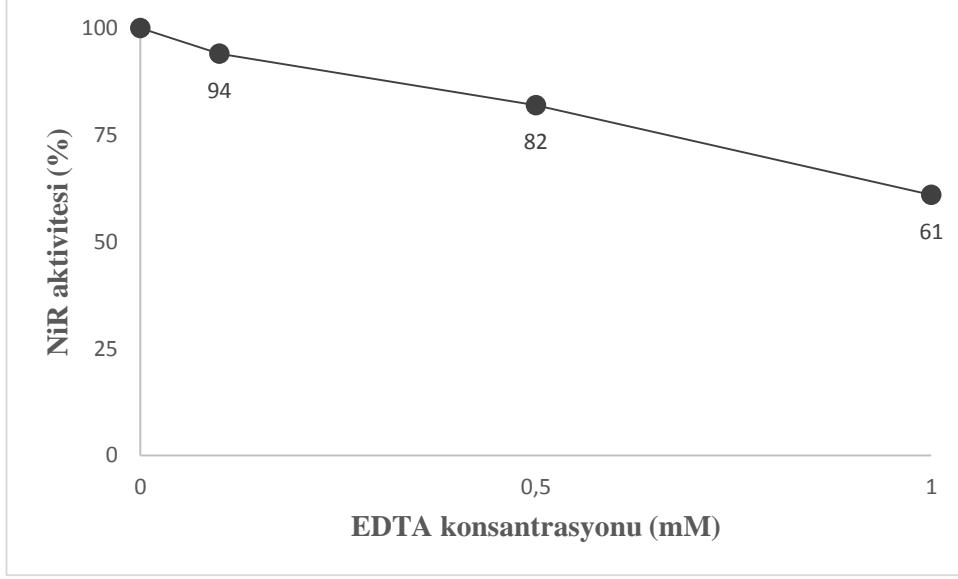


Şekil 3.10. Siyanürün NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.5.5. NiR enzim aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda EDTA içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular EDTA'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak NiR enzim aktivitesinin azaldığını ancak yine de aktivitenin %50'nin üstünde kaldığını göstermiştir. 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM EDTA içeren reaksiyon karışımındaki aktivite kaybı sırasıyla %6, %18 ve %39'dur (Şekil 3.11).

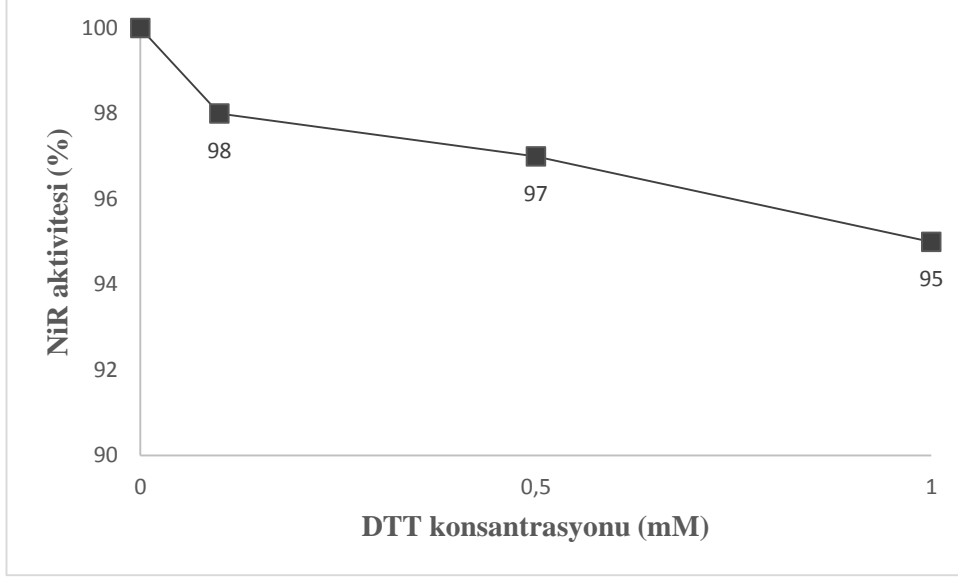


Şekil 3.11. EDTA'nın NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.5.6. NiR enzim aktivitesi üzerine DTT'nin etkisi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'luk konsantrasyonlarda DTT içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek DTT'nin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular DTT'nin artan konsantrasyonlarının NiR enzim aktivitesi üzerinde inhibe edici özellikte olmadığını göstermiştir. 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM DTT konsantrasyonu içeren reaksiyon karışımındaki aktivite kaybı sırasıyla %2, %3 ve %5'tir (Şekil 3.12).

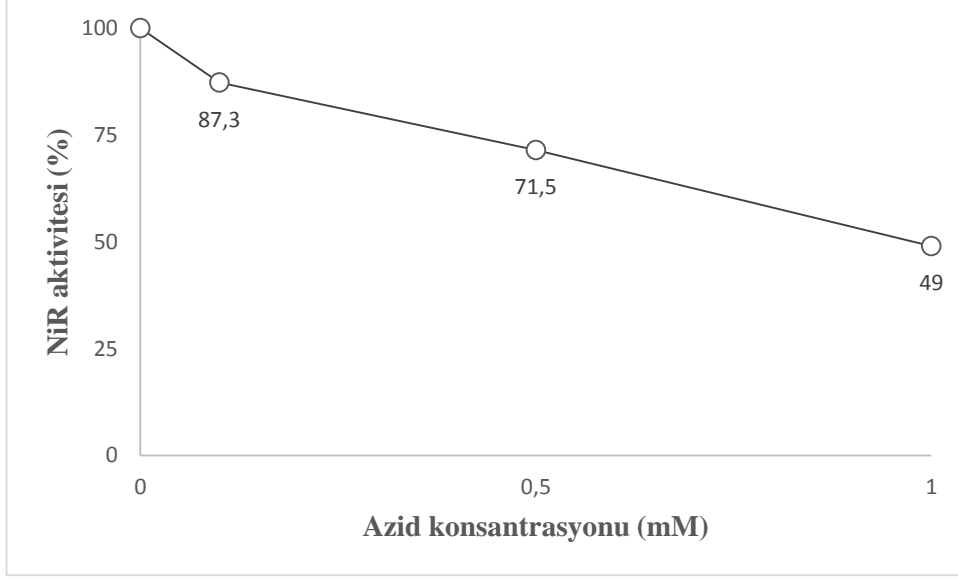


Şekil 3.12. DTT'nin NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.5.7. NiR enzim aktivitesi üzerine azidin etkisi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda sodyum azid içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek azidin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Artan azid konsantrasyonlarına bağlı olarak NiR enzim aktivitesi düşmüştür. 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM azid içeren reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesi kaybı sırasıyla %12.7, %28.5 ve %51'dir (Şekil 3.13).

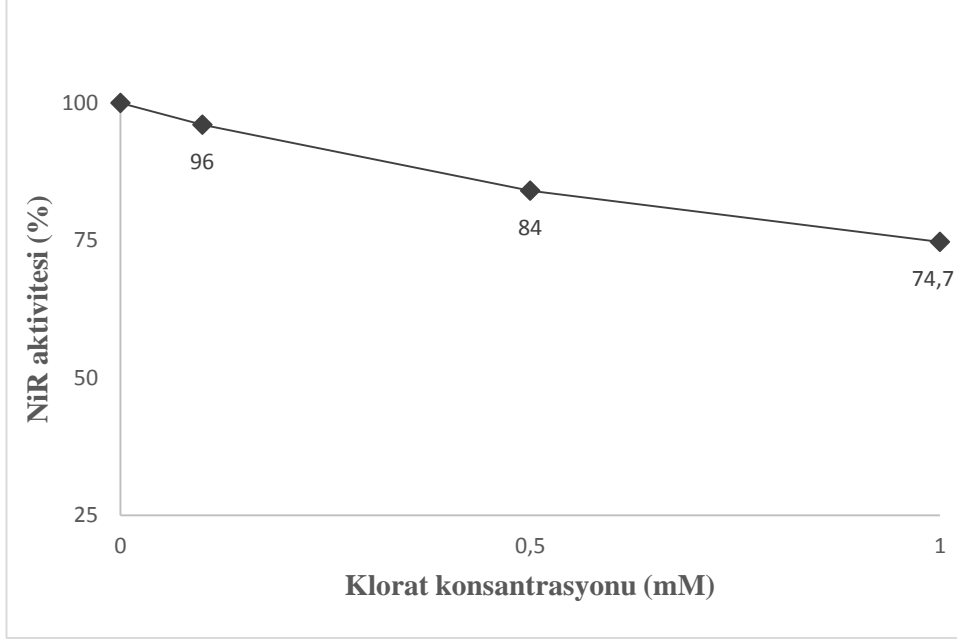


Şekil 3.13. Azidin NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.5.8. NiR enzim aktivitesi üzerine kloratın etkisi

0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda potasyum klorat içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek kloratın enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Kloratın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak NiR enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir. 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM potasyum klorat konsantrasyonu içeren reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesi kaybı sırasıyla %4, %16 ve %25.3'tür (Şekil 3.14).

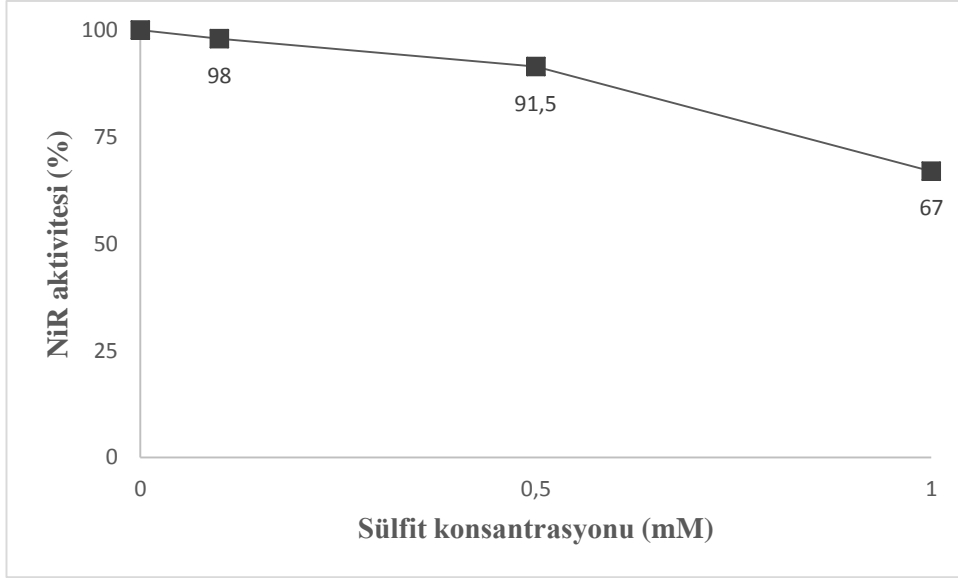


Şekil 3.14. Kloratın NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.5.9. NiR enzim aktivitesi üzerine sülfitin etkisi

Sodyum sülfid içeren 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandıktan sonra enzim reaksiyon karışımına eklenerek sülfid'in enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular sülfid'in artan konsantrasyonlarının NiR enzim aktivitesinde bir azalma meydana getirdiğini göstermiştir. Ancak bu azalma %75'nin altında değildir. 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM sülfid konsantrasyonu içeren reaksiyon karışımındaki aktivite kaybı sırasıyla %2, %8.5 ve %33'dir (Şekil 3.15).

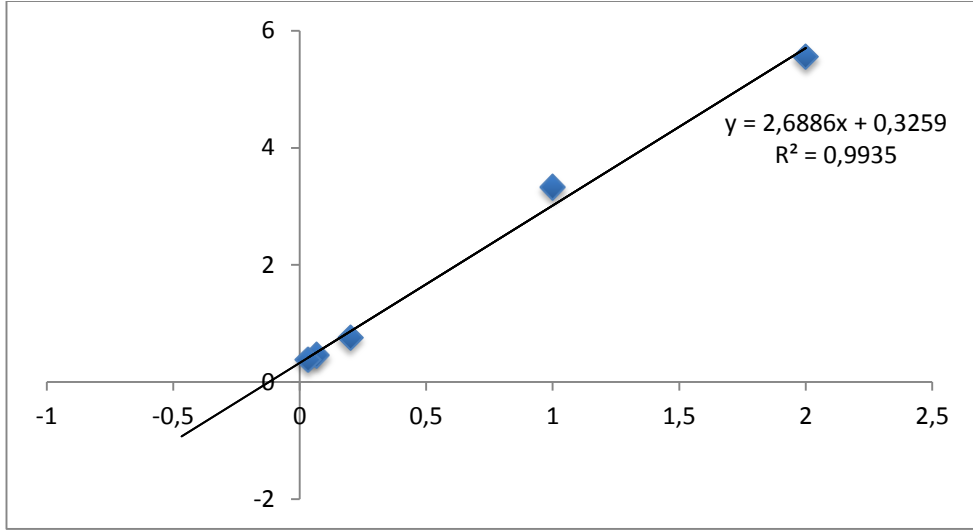


Şekil 3.15. Sülfitin NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi

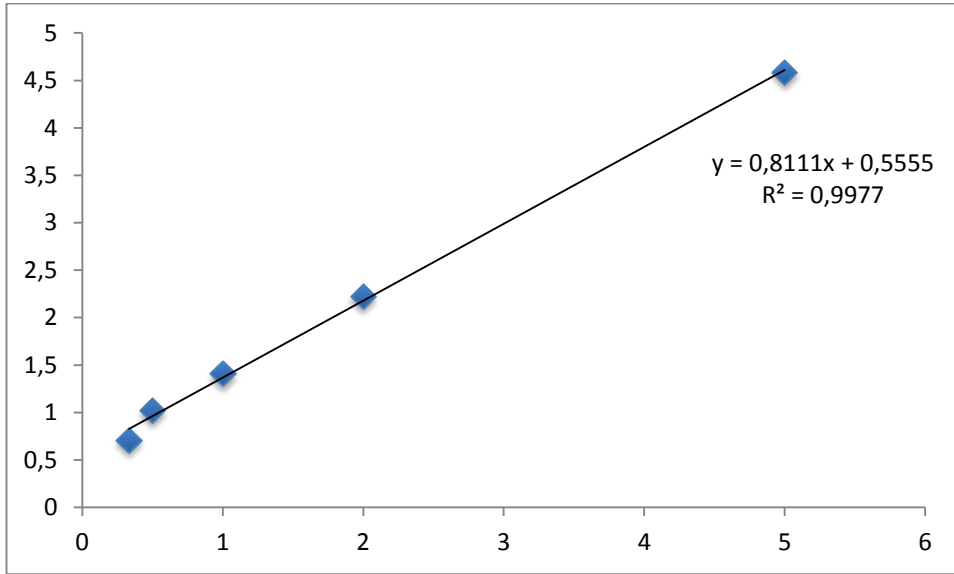
3.6. NiR Enziminin Kinetik Aktivitesinin Analizi

NiR enziminin değişen substrat konsantrasyonlarına karşı hızı ölçülerek K_m ve V_{max} değerlerini belirlenmiştir ve sonuçlar Lineweaver-Burke grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 3.17 ve 3.18).

Elde edilen bulgular NiR enziminin KNO_2 için V_{max} 'ın $3,06 \pm 0,2$ nmol NH_4 /dakika/mg protein ve K_m değerinin ise $8,25 \pm 0,2$ mM olduğunu; metil viyolojen için V_{max} 'ın $1,80 \pm 0,2$ nmol NH_4 /dakika/mg protein ve K_m değerinin ise $1,46 \pm 0,1$ mM olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.17. NiR enziminin KNO₂ için Lineweaver-Burke grafiği



Şekil 3.18. NiR enziminin MV için Lineweaver-Burke grafiği

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Asimile edici nitrat indirgenmesi sayesinde yılda 2×10^4 megaton azotun asimilasyonu sağlanmaktadır (Guerrero ve ark. 1981). Bunun yanı sıra her yıl aşırı gübrelemeden dolayı bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından kullanılmayan fazla azot bileşikleri yeraltı sularına karışmaktadır. Bu nedenle içme suyuna kadar sızan nitrat ve nitrit bileşiklerinin insan vücuduna alınması önemli sağlık tehditlerine neden olmaktadır. Özellikle nitritin hemoglobinle etkileşime girmesi dolaşım sistemindeki oksijenin taşınmasını inhibe etmektedir. Bu da kanda hemoglobinin Fe^{+2} yerine Fe^{+3} taşınmasına neden olan metahemoglobinemia hastalığına neden olmaktadır (Fewtrell 2004). Bunun yanı sıra içme suyuyla yüksek oranda nitrat ve nitrit bileşiklerinin alınımının çeşitli gastrik kanserlere neden olduğu gösterilmiştir (Bonete ve ark. 2008). Bu nedenle nitrat asimilasyonunun ve bu yolağa katılan enzimlerin araştırılması, biyokimyasal ve genomik karakterizasyonlarının tamamlanması ileriki çalışmalara ışık tutmaları ve biyoteknolojik olarak yarar sağlamaları açısından büyük bir önem arz etmektedir.

Halofilik organizmalar tuzcul ekosistemlerdeki azot döngüsünün devam etmesinden sorumlu canlılardır. Tuzcul ortamlara adapte olmuş canlılar oldukları için tuzun denatüre edici etkisine karşı dayanıklı hücresel materyale sahiptirler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişim gösterdikleri için kontaminasyon riskleri düşüktür. Bu nedenle daha ucuz ve daha geniş çaplı kültürleri yapılabildiği ve oldukça dayanıklı biyomoleküller içerdikleri için biyoteknolojik olarak büyük önem arz etmektedirler. (DasSarma ve Arora 2001).

Halofilik asimile edici nitrat asimilasyonu sırasında görev alan NAS ve NiR enzimleri Martínez-Espinosa (2001a ve b) tarafından *Haloferax mediterranei*'den ve NAS enzimi Kılıç (2010) tarafından *Haloferax alexandrinus*'tan saflaştırılmıştır. Bu tez çalışması Kılıç (2010)'ın çalışmasının devamı niteliğindedir ve *Haloferax alexandrinus*'tan ilk kez asimile edici nitrit redüktaz saflaştırılmıştır. Çalışma halofil arkelerde nitrat asimilasyonunun biyokimyasal önemini daha kapsamlı bir şekilde ortaya konması açısından önem taşımaktadır.

Haloferax alexandrinus 'un minimal besiyerinde büyütülmesi çalışmaları sonucunda hücrelerin 216. saate kadar hızlı bir şekilde büyüdükleri ve stasyoner faz sonunda yavaşlayan bir büyüme gösterdikleri görülmüştür (Şekil 3.1).

Asimile edici nitrit redüktaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği zamanı bulmak için belirli aralıklarda besiyerinden örnekler alınmıştır. 168 ile 240. saatler arasında NiR enzim aktivitesi saptanmıştır. Hücreler stasyoner faza girdikten sonra da asimile edici nitrit redüktaz üretiyor gibi görünmektedir (Şekil 3.2). Bu bulgular Martínez-Espinosa ve ark. (2001a) ile uyumludur. Ancak maksimum aktivite 192. saatte tespit edilmiştir.

Asimile edici nitrit redüktaz aktivitesinin maksimum olduğu noktadaki hücre yoğunluğu 0,946 abs'dir (600 nm) (Şekil 3.2). *Haloferax mediterranei*'nin NiR aktivitesinin en yüksek olduğu noktadaki hücre yoğunluğu (1,200 abs) ile karşılaştırıldığında bu bulgu daha düşük gibi görünmektedir (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a). Bunun nedeni hücrelerin büyütülmesinde kullanılan besiyerlerinin farklılığı olabilir. Aynı şekilde *Haloferax alexandrinus*'tan saflaştırılan NAS enziminin (Kılıç, 2010), *Haloferax mediterranei* NAS'ına göre (Martínez-Espinosa ve ark. 2001b) daha düşük absorbanlarda maksimuma ulaştığı rapor edilmiştir. İki türün aynı ortamda yaşadığı düşünüldüğünde *Haloferax mediterranei*'nin baskın tür olacağı öngörülmüştür. Bu şartlar altında *Haloferax alexandrinus*'un daha az nitrat ve nitrit asimile ederek yaşamını sürmesi gerekmektedir (Kılıç 2010). Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular da bunu doğrulamaktadır.

Haloferax alexandrinus'tan asimile edici nitrit redüktaz enzimini saflaştırmak için sırasıyla Sefaroz-4B, DEAE Selüloz ve Q-Sefaroz kolon kromatografileri kullanılmıştır. İlk basamakta proteinleri içeren ham ekstrakt moleküler ağırlığına göre fraksiyonlarına ayrılmıştır. Elde edilen fraksiyonlarda NiR enzimi 6,48 oranında saflaştırılmıştır. Daha sonra enzim içeren fraksiyonlar zayıf anyon değişim kolonu olan DEAE Selüloz kolonuna aktararak yüklerine göre ayrılmışlardır. DEAE Selüloz kromatografisinden elde edilen enzim 9,76 oranında saf halde elde edilmiştir. Son olarak kuvvetli anyon kromatografisi olan Q-Sefaroz ile proteinler tekrar yüklerine göre ayrılmıştır ve sonucunda 34,5 kat saflaşmış NiR enzimi elde edilmiştir. Saflaştırılmış NiR enziminin spesifik aktivitesi 13,47 U/mg proteindir (Çizelge 3.1). Yapılan benzer çalışmalarda

Hordeum vulgare yapraklarından 1507 kat (Serra ve ark. 1981), *Haloferax mediterranei*'den 46 kat saf NiR elde edilmiştir (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a). Bunun yanı sıra farklı organizmalardan saflaştırılan NiR'lerin spesifik aktivitesi de farklılık göstermektedir. *Neurospora crassa*'da spesifik aktivite 26.9 U/mg protein (Guerrero ve ark. 1981), ıspanakta 108 U/mg protein (Ramírez ve ark. 1966) ve *Haloferax mediterranei*'de 15.79 U/mg proteindir. Asimile edici nitrit redüktazın SDS-PAJE analizleri enzimin 62±1.8 kDa ağırlığında bir monomer olduğunu göstermiştir. Şimdiye kadar analiz edilen feredoksin bağımlı NiR'lerin hepsi monomer olup NAD(P)H bağımlı NiR'ler ise benzer boyutlarda iki alt ünite içermektedirler (140 ve 150 kDa) (Guerrero ve ark. 1981). Bununla birlikte feredoksin bağımlı NiR'ler 61-64 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip olmakla birlikte *Haloferax mediterranei*'den saflaştırılan NiR 66 kDa ağırlığındadır (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a).

Asimile edici nitrit redüktaz enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için saflaştırılmış NiR enzimi kullanılmıştır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonları belirlenmiştir. Çalışmada farklı sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarının bileşik etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular *Haloferax alexandrinus* NiR'inin 20°C'nin altında ve 1 M'dan düşük tuz konsantrasyonlarında aktiflemediğini göstermiştir. 1.5 M, 2 M ve 2.5 M tuz konsantrasyonlarında ölçülen maksimum aktivite 50°C'de gerçekleşmiştir. Tuz konsantrasyonu 3 M ve 3.5 M'a yükseltildiğinde ise maksimum aktivitenin görüldüğü sıcaklık 60°C'ye çıkmıştır. Bu bulgu Martínez-Espinosa ve ark. (2001a) tarafından *Haloferax mediterranei*'den elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

NiR enziminin optimum pH'ını belirlemek için pH 5.0 ile 10 arasında seri çözeltiler hazırlanarak enzim aktivitesine bakılmıştır. Enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH değeri 7.5 olarak bulunmuştur (Şekil 3.8). Bu değer *Haloferax mediterranei*'nin optimum pH değeri ile uyumludur. Bunun yanı sıra *Hordeum vulgare* NiR'i (optimum pH 6.0 - 6.5) dışında yeşil alglerden ve yüksek bitkilerden saflaştırılan feredoksin bağımlı asimile edici nitrit redüktazların optimum pH'larının da 7.0 ile 8.0 arasında olduğu bildirilmiştir (Serra ve ark. 1982). *Haloferax alexandrinus*'tan saflaştırılan NAS enzimine göre (optimum pH

9.5) NiR'in optimum pH'sı daha düşüktür (Kılıç 2010). Bu durum NiR enziminin aktif merkezinin NAS'a göre daha az, ancak yine de asidik aminoasitlere oranla daha çok sayıda, bazik aminoasit içerdiğinin göstergesidir.

Farklı tuzların asimile edici nitrat redüktaz aktivitesi üzerine etkileri Paggi ve ark. (1995) tarafından araştırılmıştır. Çalışma sonucunda Na⁺ ve K⁺ gibi monovalent katyonların NAS enzim aktivitesinde artışa neden olduğu, Mg⁺² ve Ca⁺² gibi divalent katyonların ise NAS aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. *Haloferax alexandrinus* (Kılıç 2010) ve *Haloferax mediterranei* (Martínez-Espinosa ve ark. 2001b) NAS'larının enzim aktiviteleri üzerine farklı tuzların etkisi araştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalara dayanarak *Haloferax alexandrinus* NiR'inin enzim aktivitesi farklı tuz konsantrasyonları varlığında incelenmiştir. Elde edilen bulgular *Haloferax alexandrinus* NiR'inin Mg⁺² gibi katyonlar varlığında aktivite göstermediğini ve Na⁺ ve K⁺ içeren tuzların varlığında aktivite gösterdiğini kanıtlamaktadır (Şekil 3.9). Bunun yanı sıra *Haloferax alexandrinus* NAS'ıyla paralel bir şekilde KCl tuzunun varlığında NiR enzimi NaCl'ye göre %100'ün üstünde bir aktivite göstermiştir (Kılıç 2010).

Çalışmada farklı inhibitörlerin NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Asimile edici nitrit redüktaz aktivitesinin nitrit benzeri inorganik moleküllerle (siyanür, sülfid) kompetitif ya da non-kompetitif olarak inhibe olduğu bilinmektedir (Guerrero ve ark. 1981). Bu çalışmada NiR enzim aktivitesi üzerine siyanürün artan konsantrasyonlarda etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgular 1 mM'lık siyanür konsantrasyonu içeren reaksiyon karışımında %93.5 aktivite kaybı olduğunu göstermiştir (Şekil 3.10). Bu bulgular *E. coli* (Coleman ve ark. 1978), *Hordeum vulgare* (Serra ve ark. 1981) ve *Neurospora crassa*'dan (Lafferty ve Garrett 1974) saflaştırılan NAD(P)H-bağımlı asimile edici nitrit redüktazlar ile ıspanak (Ramírez ve ark. 1966), *Nostoc muscorum* (Guerrero ve ark. 1981) ve *Haloferax mediterranei*'den saflaştırılan ferredoksin-bağımlı asimile edici nitrit redüktazlarla uyumludur. Martínez-Espinosa ve ark. (2001a) siyanür varlığında *Haloferax mediterranei* NiR'inin %90.5 oranında enzim aktivitesi kaybettiğini rapor etmiştir.

Bu tez çalışmasında NiR enzim aktivitesi üzerine inhibe edici etkisi araştırılan diğer bir madde ise etilendiamin tetraasetik asittir (EDTA). Elde edilen bulgular EDTA'nın artan konsantrasyonlarının NiR enzim aktivitesini artan oranlarda inhibe ettiğini göstermiştir. 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM EDTA içeren reaksiyon karışımlarındaki aktivite kayıpları sırasıyla %6, %19 ve %39'dur (Şekil 3.11). Bu bulgular Martínez-Espinosa ve ark. (2001a) tarafından rapor edilen bulgulara göre (1 mM EDTA konsantrasyonu - %53 aktivite kaybı) daha düşüktür. Bu sonuçlara dayanarak *Haloferax alexandrinus* NiR'inin *Haloferax mediterranei* NiR'ine göre EDTA'dan daha az etkilendiği söylenebilir.

Ditiotreitolün (DTT) NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi artan DTT konsantrasyonlarına bağlı olarak araştırılmıştır. Elde edilen bulgular en yüksek DTT konsantrasyonunun bile (1 mM) %5 oranında enzim aktivitesini düşürdüğünü göstermiştir (Şekil 3.12). Aynı şekilde *Haloferax alexandrinus* NAS'ı ve *Haloferax mediterranei* NiR'i de DTT tarafından inhibe edilmemektedir (Kılıç 2010; Martínez-Espinosa ve ark. 2001a).

Azidin asimile edici nitrat redüktazların güçlü bir inhibitörü olduğu bilinmektedir (Guerrero ve ark. 1981). Bu tez çalışmasında azidin asimile edici nitrit redüktaz üzerine inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular azidin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak NiR enzim aktivitesinde maksimum %51 oranında bir kayıp olduğunu göstermiştir. 0,1 mM, 0.5 mM ve 1.0 mM azid konsantrasyonu içeren reaksiyon karışımlarındaki aktivite kaybı sırasıyla %12.7, %28.5 ve %51'dir (Şekil 3.13). Bu bulgular Martínez-Espinosa ve ark. (2001a) tarafından rapor edilen bulgularla (1 mM azid konsantrasyonu- %46) uyumludur. Ancak *Haloferax alexandrinus* NAS'ı azid varlığında %90 oranında (1 mM) inhibe olmaktadır (Kılıç, 2010).

Bu tez çalışmasında kloratın artan konsantrasyonlarının NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM klorat konsantrasyonu içeren reaksiyon karışımlarında sırasıyla %4, %16 ve %25.3 oranında enzim aktivitesi kaybı tespit edilmiştir (Şekil 3.14). Bu bulgular *Haloferax mediterranei* NiR'inden elde edilen bulgularla uyumludur (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a).

Sülfitin NAD(P)H bağımlı asimile edici nitrit redüktazları inhibe ettiği bilinmektedir (Guerrero ve ark. 1981). Bu çalışmada sülfitin artan konsantrasyonlarının NiR enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular sülfitin 0.1 mM ve 0.5 mM konsantrasyonlarını içeren reaksiyon karışımlarında göz ardı edilebilir seviyede bir aktivite azalması (sırasıyla %2 ve %8.5) olduğunu ancak 1 mM sülfit konsantrasyonu içeren reaksiyon karışımında %33'lük bir aktivite kaybı olduğunu göstermiştir (Şekil 3.15). *Haloferax mediterranei* NiR'i 1 mM sülfit ile %25 aktivite kaybı göstermektedir (Martínez-Espinosa ve ark. 2001a). Bununla birlikte *Haloferax mediterranei* NAS'ı sülfit varlığında inhibe olmazken *Haloferax alexandrinus* NAS 1 mM sülfit varlığında %30 inhibe olmaktadır (Kılıç 2010). Bu bulgular *Haloferax alexandrinus*'un sülfite karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Haloferax alexandrinus asimile edici nitrit redüktazının KNO₂ ve metil viyolojenle ilişkili K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek için Lineweaver-Burke grafiğinden yararlanılmıştır. *Haloferax alexandrinus* NiR'inin K_m değerleri KNO₂ ve metil viyolojen için sırasıyla 8,25 mM ve 1,46 mM'dır. *Haloferax mediterranei* ile karşılaştırıldığında (sırasıyla 8,60 mM ve 1,9 mM) *Haloferax alexandrinus* NiR'inin substratına daha fazla ilgisi olduğu görülmektedir. Bu da *H. alexandrinus* asimile edici nitrit redüktaz enziminin *H. mediterranei*'ninkine oranla daha aktif bir enzim olduğunu göstermektedir. Çeşitli organizmalardan saflaştırılan NiR'lerin substrata karşı K_m değerleri çeşitlilik göstermektedir. *Porphyra yezoensis*'te 0,81 mM, *Cucurbita pepo*'da 0,001 mM ve *Neurospora crassa*'da 0,01 mM olarak rapor edilmiştir (Guerrero ve ark. 1981).

Bu tez çalışması *Haloferax alexandrinus* asimile edici nitrit redüktaz enziminin biyokimyasal ve moleküler özelliklerini ilk kez ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra çalışmada saflaştırılan NiR enzimi arkelerden saflaştırılan ikinci asimile edici nitrit redüktaz enzimidir. Asimile edici nitrit redüktaz enzimi 34,5 oranında saflaştırılmıştır. Siyanür, azid, sülfit, klorat ve EDTA varlığında enzimin aktivitesi azalmaktadır. *Haloferax mediterranei* NiR'ine göre daha aktif bir enzim olmakla beraber ortamdaki sülfite *H. mediterranei*'ye göre daha duyarlıdır. 60°C gibi sıcaklıklarda ve yüksek tuz konsantrasyonlarında stabil kalabildiği için endüstride ve biyoteknolojide kullanımına yönelik çalışmalar yapılması yararlı

olacaktır. Bunun yanı sıra nitrat ve nitrit asimilasyonunun sağlık, tarım ve ekoloji açısından önemi nedeniyle bu yolağın farklı organizmalarda daha geniş çaplı çalışılması önem arz etmektedir. Özellikle ekstremofilik organizmaların kolay ve ucuz kültüre edilebilmeleri ve ekstrem şartlara dayanıklı olmaları nedeniyle farklı alanlarda kullanılabilircek farklı enzimlerin izole edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Albers, S. V. ve Meyer, B. H. (2011), "The archaeal cell envelope", *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 414-426.
- Aparicio, P. J., Knaff, D. B. ve Malkin, R. (1975), "The role of an iron-sulfur center and siroheme in spinach nitrite reductase", *Archives of biochemistry and biophysics*, 169(1), 102-107.
- Asker, D. ve Ohta, Y., (2002a), "*Haloferax alexandrinus* sp. Nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt)" *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **52**, 729-738
- Asker, D., Awad, T. ve Ohta, Y. (2002b), "Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TM T: an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon", *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(1), 37-43.
- Bell, S. D. ve Jackson, S. P. (1998), "Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features", *Trends in microbiology*, 6(6), 222-228.
- Berks, B.C., Richardson, D.J., Reilly, A., Willis, A.C. ve Ferguson, S.J. (1995), "The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*" *Biochem. J.*, 309, 983-992.
- Blasco, R., Castillo, F. ve Martinez-Luque, M. (1997), "The assimilatory nitrate reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* EIF1, is a flavoprotein", *FEBS Lett.* 414, 45-49.
- Bonete, M. J., Martínez-Espinosa, R. M., Pire, C., Zafrilla, B. ve Richardson, D. J. (2008), "Nitrogen metabolism in haloarchaea", *Saline Systems*, 4(9), 1-12.
- Bradford, M., (1976), "A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenner, D.J., Staley, J.T. ve Krieg, N.R., (2001), *Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology V.I*, "The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria", Garrity, G.M. (Man. Ed.), 2nd Ed. New York, Springer.

- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. ve Forterre, P. (2008), “Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota”, *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 245-252.
- Cabello, P., Roldan, M.D. ve Morena-Vivian, C. (2004), “Nitrat reduction and nitrogen cycle in archaea”, *Microbiology*, Vol 150, s 3527-3546.
- Campbell, W. H. (2001), “Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase”, *Cell Mol Life Sci* 58, 194-204.
- Campbell, W. H. ve Kinghorn, J. R. (1990), “Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases”, *Trends in biochemical sciences*, 15(8), 315-319.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N. ve Falkowski, P. G. (2010), “The evolution and future of Earth’s nitrogen cycle”, *Science*, 330(6001), 192-196.
- Chaban, B., Ng, S. Y. ve Jarrell, K. F. (2006), “Archaeal habitats-from the extreme to the ordinary”, *Canadian journal of microbiology*, 52(2), 73-116.
- Coleman, K. J., Cornish-Bowden, A. ve Cole, J. A. (1978), “Purification and properties of nitrite reductase from Escherichia coli K12”, *Biochem. j*, 175, 483-493.
- Cutler, P. (2004), Protein Purification Protocols, Methods in Molecular Biology, vol 244, s 512, Humana Pres, New York.
- DasSarma, S. ve Arora, P. (2001), “Halophiles, Encyclopedia of Life Sciences”, *Nature Publishing Group*, www.els.net.
- Dore, J. E., Popp, B. N., Karl, D. M. ve Sansone, F. J. (1998), “A large source of atmospheric nitrous oxide from subtropical North Pacific surface waters”, *Nature*, 396(6706), 63-66.
- Esko J.D., Doering, T. L. ve Raetz, C. R. H. (2009), Eubacteria and Archaea. In Essentials of Glycobiology. A. Varki, R.D. Cummings, ..., M.E. Etzler, (editörler). Cold Spring Harbor, NY.
- Fernández, E., Galván, A. ve Quesada, A. (1998), *Nitrogen assimilation and its regulation*, The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas* (pp. 637-659). Springer Netherlands.
- Fewtrell, L. (2004), “Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion”, *Environmental health perspectives*, 1371-1374.

- Garrett, R. H. (1972), "The induction of nitrite reductase in *Neurospora crassa*". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 264(3), 481-489.
- Garrett, R. H. ve Amy, N. K. (1979), "Nitrate assimilation in fungi", *Adv. Microbiol. Physiol*, 18, 1-65.
- Guerrero, M. G., Vega, J. M. ve Losada, M. (1981), "The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation" *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), 169-204.
- Guerrero, M. G., Vega, J. M., Leadbetter, E. ve Losada, M. (1973), "Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*", *Archiv für Mikrobiologie*, 91(4), 287-304.
- Hara, K., Shinzato, N., Seo, M., Oshima, T. ve Yamagishi, A. (2002), "Phylogenetic Analysis of Symbiotic Archaea Living in the Gut of Xylophagous Cockroaches", *Microbes and Environments*, 17(4), 185-190.
- Ho, C. H., Ikawa, T. ve Nisizawa, K. (1976). "Purification and properties of a nitrite reductase from *Porphyra yezoensis* Ueda", *Plant and Cell Physiology*, 17(3), 417-430.
- Hucklesby, D. P., James, D. M., Banwell, M. J. ve Hewitt, E. J. (1976), "Properties of nitrite reductase from *Cucurbita pepo*". *Phytochemistry*, 15(5), 599-603.
- Kazan, D., (1997), *Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar*, Lisans Üstü Yaz Okulu, Tübitak, Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermentasyon Grubu, sayfa 151-186.
- Kılıç, V., (2010), *Haloferax alexandrinus'dan (Euryarchaeota-Archaea) Asimile Edici Nitrat Redüktazın Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Krueger, R. J. ve Siegel, L. M. (1982), "Spinach siroheme enzymes: isolation and characterization of ferredoxin-sulfite reductase and comparison of properties with ferredoxin-nitrite reductase", *Biochemistry*, 21(12), 2892-2904.
- Kushner, D. (1985), "The Halobacteriaceae", (Ed: Woose, C.R., Wolfe, S.), *The bacteria*, Vol 8, 171-214 Academic Press London.

- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafferty, M. A. ve Garrett, R. H. (1974), "Purification and properties of the *Neurospora crassa* assimilatory nitrite reductase", *Journal of Biological Chemistry*, 249(23), 7555-7567.
- Lancaster, J. R., Vega, J. M., Kamin, H., Orme-Johnson, N. R., Orme-Johnson, W. H., Krueger, R. J. ve Siegel, L. M. (1979), "Identification of the iron-sulfur center of spinach ferredoxin-nitrite reductase as a tetranuclear center, and preliminary EPR studies of mechanism", *Journal of Biological Chemistry*, 254(4), 1268-1272.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. ve Zillig, W. (1995), "Transcription in archaea: similarity to that in eucarya", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 5768-5772.
- Lindås, A. C., ve Bernander, R. (2013), "The cell cycle of archaea", *Nature Reviews Microbiology*, 11(9), 627-638.
- Luque, I., Flores, E. ve Herrero, A. (1993), "Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC7942: homology between cyanobacterial and higherplant nitrite reductases", *Plant Mol. Biol.*, 21, 1201-1205.
- Martínez-Espinosa, R. M., Marhuenda-Egea, F. C. ve Bonete, M. J., (2001b), "Assimilatory nitrate reductase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: purification and characterization", *FEMS Microbiology Letters*, Vol 204, 381-385.
- Martínez-Espinosa, R.M., Marhuenda-Egea, F.C. ve Bonete, M.J., (2001a), "Purification and characterisation of a possible assimilatory nitrite reductase from the halophile archaeon *Haloferax mediterranei*", *FEMS Microbiology Letters* **196**, 113-118.
- Moreno-Vivián, C. ve Ferguson, S. J. (1998), "Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways". *Molecular microbiology*, 29(2), 664-666.

- Moreno-Vivian, C., Cabello P., Martinez-Luque, M., Blasco, R. ve Castillo F., (1999), "Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases", *Journal of Bacteriology*, vol. 181., No 21, p. 6573-6584.
- Mutlu, M.B., Martinez-Garcia, M., Santos, F., Pena, A., Guven, K. ve Anton, J., (2008), "Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey", *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 65, Number 3, Pp: 474-483.
- Oren, A. (2008), "Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity," *Saline Systems*, 4:2, doi:10.1186/1746-1448-4-2.
- Paggi, R. A., De Castro, R. E., Kerber, N. L. ve Garcia, A. F. (1995), "Effect of salts on the activity of nitrate reductase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SW", *Journal of basic microbiology*, 35(1), 47-52.
- Ramirez, J. M., Del Campo, F. F., Paneque, A. ve Losada, M. (1966), "Ferredoxin-nitrite reductase from spinach", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 118(1), 58-71.
- Rivas, J., Guerrero, M. G., Paneque, A. ve Losada, M. (1973), "Characterization of the nitrate-reducing system of the yeast *Torulopsis nitratophila*", *Plant Science Letters*, 1(3), 105-113.
- Rodriguez-Valera, F. (1988), "Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments", p. 3-30, Rodriguez-Valera, F. (ed.), *Halophilic bacteria*, vol. 1. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Rodriguez-Valera, F., Nieto, J. J. ve Ruiz-Berraquero, F. (1983), "Light as an energy source in continuous cultures of bacteriorhodopsin-containing halobacteria", *Applied and environmental microbiology*, 45(3), 868-871.
- Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. ve Ramos-Cormenzana, A. (1980), "Isolation of Extremely Halophilic Bacteria Able to Grow in Defined Inorganic Media with Single Carbon Sources", *Journal of General Microbiology*, 119, 535-538.
- Schleper, C., Pühler, G., Klenk, H. P. ve Zillig, W. (1996), "*Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., two species of hyperacidophilic, thermophilic, heterotrophic, aerobic archaea", *International journal of systematic bacteriology*, 46(3), 814-816.

- Seegerer, A., Neuner, A., Kristjansson, J. K. ve Stetter, K. O. (1986), “*Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36(4), 559-564.
- Serra, J. L., Ibarlucea, J. M., Arizmendi, J. M. ve Llama, M. J. (1982), “Purification and properties of the assimilatory nitrite reductase from barley *Hordeum vulgare* leaves”, *Biochemical Journal*, 201(1), 167–170.
- Snell, C.D. ve Snell, C.T. (1949), *Colorimetric Methods of Analysis*, Vol. 2, pp. 802-807. Van Nostrand, New York
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M. W., ... ve Le Paslier, D. (2006), “Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome”, *Nature*, 440(7085), 790-794.
- Vega, J. M. ve Garrett, R. H. (1975), “Siroheme: a prosthetic group of the *Neurospora crassa* assimilatory nitrite reductase”, *Journal of Biological Chemistry*, 250(20), 7980-7989.
- Vega, J. M. ve Kamin, H. (1977), “Spinach nitrite reductase. Purification and properties of a siroheme-containing iron-sulfur enzyme”, *Journal of Biological Chemistry*, 252(3), 896-909.
- Vega, J., Cárdenas, J. ve Losada, M. (1980), “Ferredoxin-nitrite reductase”, *Methods in Enzymology*, 69, 255-270.
- Woese C. ve Fox G. (1977), "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms.". *Proc Natl Acad Sci ABD* 74 (11): 5088–90.
- Woese, C. R., Kanler, O. ve Wheelis M.L. (1990), “Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya”, *Proc. Natl. Acad. Sci. ABD*. 87, 4576-4579.
- Zumft, W. G. (1972), “Ferredoxin: nitrite oxidoreductase from *Chlorella*: Purification and properties”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 276(2), 363-375.
- Zumft, W. G. (1997), “Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 533-616.