

TAM OTOMATİK İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÖLÇÜM KİTİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT ÜRETİMİ

ÖZET

İzositrat dehidrogenaz (IDH) enzimi izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu gerçekleştirerek α -ketoglutarat (α -KG) ve karbondioksit (CO_2) üretimini katalizleyen bir enzimdir. Metabolizmada birçok dokuda yoğun olarak bulunan bu enzimin nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH+H) kaynağı olarak görev yapmasının yanında glukoz, yağ asidi ve glutamin metabolizmasında rolü olduğu bilinmektedir. NADPH+H molekülü hem hücrel biyosentez reaksiyonlarında hem de indirgeyici ekivalan molekül olarak kullanılması sebebiyle antioksidanlara karşı savunmada büyük role sahiptir. IDH enziminde gerçekleşen mutasyonlar enzimde neomorfik aktiviteye yol açarak normalde ürün olarak ortaya çıkan α -KG' ı substrat olarak kullanmasına ve NADPH+H üretiminin aksine tüketimine sebep olur. Bu değişim hücrel düzeyde birçok yolağı etkileyerek kanser gelişimine yol açar. Başta gliomalar olmak üzere; lösemi, lenfoma, kolanjiokarsinoma, kondrosarkoma ve pankreas tümörlerinde de IDH mutasyonu bildirilmiştir. Serumda NADP⁺-bağımlı IDH aktivitesi artışının, karaciğer doku hasarının belirlenmesinde rutinde kullanılan aspartat amino transferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), γ -glutamil transferaz (GGT) enzimlerinden daha hassas sonuçlar verdiği bilinmektedir.

Klinik olarak büyük öneme sahip bu enzimin ve mutant formunun aktivitesindeki değişiklikleri tespit edebilecek basit ve ucuz bir yöntem bulunmamaktadır. Mutant enzim ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler biyopsi ile alınan doku örnekleri ile çalışılan, girişim gerektiren tekniklerdir. Bu çalışma ile NADP⁺-bağımlı normal ve mutant IDH enzim aktivitesinin hastalardan alınan kan örnekleri ile çalışılabilecek ve tüm rutin biyokimya laboratuvarlarında bulunan otomatik kimya analizörleri ile uyumlu olarak kullanılabilen bir kit geliştirilmesi planlanmıştır. Enzimin kofaktör olarak kullandığı molekül olan NADPH+H molekülünün 340 nm'de verdiği absorbans değişiminden yararlanılarak spektrofotometrik yöntemle enzim aktivitesi hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmıştır. Geliştirilecek kit çalışmalarında kullanılmak üzere kalibratör-kontrol materyali olarak kullanılabilen mutant ve normal form NADP⁺-bağımlı IDH enzimlerinin rekombinant üretimi hedeflenmiştir. Çalışmanın seyri sırasında mutant enzimin aktivitesinin ölçüme uygun olmadığı tespit edilmiştir.

NADP⁺-bağımlı IDH aktivitesi ölçüm metodunun geliştirilmesi çalışmaları ile 2 nin altında % CV değeri, LoB 0.1744 U/L performans özelliklerine sahip 0 – 1200 U/L arasında doğrusal olan bir ölçüm kiti üretilmiştir. Hem normal form hem de R132H mutant form NADP⁺-bağımlı IDH enzimlerinin ökaryotik bir mikroorganizma olan

Pichia Pastoris maya hücrelerinde rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant üretilen normal NADP⁺-bağımlı IDH enziminin izositrat için V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 4.55 µM/dk ve 108 µM olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: İzositrat dehidrogenaz, enzim aktivite ölçümü, rekombinant, *Pichia Pastoris*.

DEVELOPMENT OF FULLY AUTOMATED ISOCITRATE DEHYDROGENASE ENZYME ACTIVITY ASSAY KIT AND RECOMBINANT PRODUCTION OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE ENZYME

SUMMARY

Isocitrate dehydrogenase (IDH) is an enzyme that catalyzes the production of α -ketoglutarate (α -KG) and carbon dioxide (CO_2) by performing the oxidative decarboxylation of isocitrate. It is known that this enzyme, which is intensely found in many tissue, acts as a source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH + H) and plays a crucial role in glucose, fatty acid and glutamine metabolism. The NADPH + H molecule has an important role in both cellular biosynthesis reactions and in defense against oxidants due to its use as a reducing equivalent molecule. Mutations in the IDH enzyme lead to neomorphic activity in the enzyme, causing it to use α -KG, which normally occurs as a product, as a substrate and consume it contrary to the production of NADPH + H. This change causes cancer development by affecting many pathways at the cellular level especially in gliomas; IDH mutation has also been reported in leukemia, lymphoma, cholangiocarcinoma, chondrosarcoma and pancreatic tumors. It is also known that increased NADP⁺-dependent IDH activity in serum gives more sensitive results than aspartate amino transferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transferase (GGT) enzymes, which are routinely used in the determination of liver tissue damage.

There is no simple and inexpensive method that can detect changes in the activity of this clinically important enzyme and its mutant form. The methods used in investigating on mutant enzymes are techniques that require intervention and work with tissue samples taken by biopsy. With this study, it is planned to develop a kit that can be used in automated chemistry analyzers which are based in all routine biochemistry laboratories. It is intended to measure the NADP⁺-dependent normal and mutant IDH enzyme activity in blood samples that had already been taken from patients. It is aimed to have information about enzyme activity using spectrophotometric method by tracking the absorbance change at 340 nm of NADPH+H molecule, which is a molecule used by the enzyme as a cofactor. It is aimed to produce recombinant mutant and normal form of NADP⁺-dependent IDH enzymes that can be used as calibrator-control material to be used in the kit studies to be developed. During the course of the study, it was determined that the activity of the mutant enzyme was not suitable for measurement as initially planned.

With the development of the NADP⁺-dependent IDH activity measurement method, a linear measurement kit with a CV % value of less than 2, LoB 0.1744 U / L performance characteristics between 0 - 1200 U / L was produced. Recombinant

production of both normal form and R132H mutant form NADP⁺-dependent IDH enzymes was performed in *Pichia Pastoris* yeast cells, an eukaryotic microorganism. V_{\max} and K_M values of recombinant normal NADP⁺-dependent IDH enzyme for its substrate were found as 4.55 $\mu\text{M} / \text{min}$ and 108 μM , respectively.

Keywords: Isocitrate dehydrogenase, enzyme activity measurement, recombinant, *Pichia Pastoris*.