

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 ($\text{NADPH}+\text{H}$) kaynağı olarak görev yapmasının yanında glukoz, yağ asidi ve glutamin metabolizmasında rolü olduğu bilinmektedir. $\text{NADPH}+\text{H}$ 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 $\text{NADPH}+\text{H}$ 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. Klinik olarak büyük öneme sahip bu enzim için mutasyon varlığını tespit edebilecek basit ve ucuz bir yöntem bulunmamaktadır. Mevcut yöntemler biyopsi ile alınan doku örnekleri ile çalışılan, girişim gerektiren tekniklerdir. Bu çalışma ile mutant IDH enzim aktivitesinin hastalardan alınan kan örnekleri ile çalışılabilecek ve tüm rutin biyokimya laboratuvarlarında bulunan otomatik kimya analizörleri ile uyumlu olarak kullanılabilir kit geliştirilmesi planlanmıştır. Enzimin kofaktör olarak kullandığı molekül olan $\text{NADPH}+\text{H}$ 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 kullanılabilir mutant IDH enziminin rekombinant üretimi hedeflenmiştir. Çalışmanın seyri sırasında mutant enzimin aktivitesinin ölçüme uygun olmadığı tespit edilmiştir.

Serumda normal IDH1 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. Fakat bu enzimin aktivitesinin ölçümü için rutin klinik kullanıma uygun otomatize sistemlerde kullanılabilir bir yöntem bulunmamaktadır.

Ön çalışma ve değerlendirme amacıyla başlanan mutant olmayan NADP⁺-IDH 1 aktivitesi ölçüm metodunun geliştirilmesi ve standardize edilmesi ikinci hedefler arasında yer almaktadır. Bunun sonucunda göre 2 nin altında % CV değeri, LoB 0.1744 U/L performans özelliklerine sahip 0 – 1200 U/L arasında doğrusal olan bir ölçüm kiti üretilmiştir.

Anahtar kelimeler: NADP⁺-bağımlı izositrat dehidrogenaz, R132H mutant izositrat dehidrogenaz, enzim aktivite ölçümü, rekombinant, *Pichia Pastoris*.

SUMMARY

Isocitrate dehydrogenase (IDH) is an enzyme that catalyzes the production of α -ketoglutarate (α -KG) and carbon dioxide (CO₂) by performing the oxidative decarboxylation of isocitrate. It is known that this enzyme, which is intensely found in many tissues in metabolism, acts as a source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH + H) and plays important role in glucose, fatty acid and glutamine metabolism. The NADPH + H molecule has a significant role in both cellular biosynthesis reactions and in defense against antioxidants due to using 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 gliomas; IDH mutation has also been reported in leukemia, lymphoma, cholangiocarcinoma, chondrosarcoma and pancreatic tumors. There is no simple and inexpensive method to detect the presence of mutation for this clinically important enzyme. Current methods are techniques that work with tissue samples taken by biopsy and require intervention. With this study, it is planned to develop a kit that can be used to study the mutant IDH enzyme activity with blood samples taken from patients and can be used in accordance with automatic chemistry analyzers found in all routine biochemistry laboratories. It is aimed to gain information about enzyme activity by spectrophotometric method by using the absorbance change at 340 nm of NADPH + H molecule, which is the molecule used by the enzyme as a cofactor. It is aimed to produce recombinant mutant IDH enzyme that can be used as a 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.

It is known that increased normal IDH1 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. However, there is no method that can be used in automated systems suitable for routine clinical use to measure the activity of this enzyme.

Development and standardization of the non-mutant NADP⁺-dependent IDH 1 activity measurement method, which was initiated for preliminary study and evaluation, is among the second goals. As a result, a measurement kit with CV% value below 2 and linear between 0 - 1200 U / L with LoB 0.1744 U / L performance characteristics was produced.

Keywords: NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase, R132H mutant isocitrate dehydrogenase, enzyme activity measurement, recombinant, *Pichia Pastoris*.