

TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI

2019

1. H*** B**** Candida Boidinii Kaynaklı Nad⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Üretilmesi, Enzim Aktivitesinin ve Termal Stabilitesinin Artırılması
2. E*** M**** G**** Kolon Kanseri Hücreleri Üzerine Timokinon ve 5-Fluorouracilin Terapotik Etkisinin In Vitro ve In Vivo Araştırılması
3. H*** G**** Ç***** Tam otomatik bakır ölçüm kitinin geliştirilmesi

***Candida boidinii* KAYNAKLI NAD⁺ BAĞIMLI FORMAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ, ENZİM AKTİVİTESİNİN VE TERMAL
STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI**

ÖZET

Farklı endüstrilerde geniş bir kullanım alanına sahip olan enzimler, hastalıkların tanısında kullanılan biyokimyasal analizler için de önemlidir. Format (formik asit) tek karbonlu endojen bir metabolit olup, insan serumunda ve idrarında belirli seviyelerde bulunur. Format düzeylerinin insan serumu ve idrarında özellikle metanol intoksikasyonu, vitamin B eksiklikleri, astım, çeşitli psikiyatrik bozukluklar ve farklı patolojik durumlara bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Format Dehidrojenaz (FDH), format için mutlak özgüllük gösteren ve ortamda bulunan formattan elektronları NAD⁺'ye transfer eden bir enzimdir. Reaksiyonun sonunda oluşan NADH + H miktarı, reaksiyona giren formatın miktarı ile doğru orantılıdır. Tez projesi ile amacımız, NAD⁺ bağımlı FDH enziminin rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmesi, enzim aktivitesinin ve termal stabilitesinin artırılmasıdır.

Çalışmamızda, *Candida boidinii* (Cbo) FDH proteinini kodlayan 1095 baz çift geni, bir şablon olarak kullanılarak Polimez Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. Ürün pET-23b (+) ifade vektörüne klonlandıktan sonra ekspresyon için *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 (DE3) hücrelerine transfer edildi. Üretilen CboFDH enziminin saflaştırılması için afinite His-Trap kolonu kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümleri 340 nm'de NADH miktarının fotometrik ölçümü ile gerçekleştirildi. Moleküller arası etkileşimler üzerinde yapılan mutasyonların etkisini tahmin etmek için, Gaussian 09 yazılımına mevcut kristal yapı (PDB: 5DN9) tanıtıldı ve mutasyon yapılacak bölgeler tahmin edildi. Daha sonra, enzim aktivitesini ve termal stabilitesini artırmaya yönelik olarak Val120Thr, Phe285Thr, Gln287Glu, His311Gln ve Phe285Thr/His311Gln mutasyonları gerçekleştirildi. Mutasyonla aminoasitleri değiştirilmiş enzimin yapısı geometrik optimizasyon ile kendi ortamında gerçek forma en yakın şekilde modellendi. Sonuçlar Pymol paket yazılımı ile görselleştirilerek tartışıldı.

Hem yabanıl tip hem de mutant FDH'ler için kinetik ve termostabilite çalışmaları yapıldı. Çalışmada ayrıca, yabanıl tip FDH ve mutant FDH suşlarının enzim aktivitesi üzerinde farklı metal iyonlarının ve organik çözücülerin etkisi araştırıldı. Yabanıl tip ve mutant enzimlerin ikincil yapıları ve termal stabilite çalışmaları dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi ile incelendi. Çalışma sonucunda rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen yabanıl tip CboFDH için uygun pH 7.4, optimum sıcaklık ise 40 °C bulunurken; mutant enzimler için optimum pH ve sıcaklıklar, Phe285ThrFDH için pH 7, sıcaklık 40 °C, Val120ThrFDH için pH 7, sıcaklık 40 °C, Gln287GluFDH için pH 7, sıcaklık 60 °C, His311GlnFDH için pH 7, sıcaklık 65 °C ve Phe285Thr/His311GlnFDH için pH 8, sıcaklık 65 °C olarak bulundu. CD cihazı ile α -heliks ikincil yapıları belirlenen yabanıl tip ve mutant enzimlerin termal denatürasyon (Tm) sıcaklıkları yabanıl tip CboFDH için 64 °C, Gln287GluFDH için 70 °C, His311GlnFDH için 77 °C ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 73 °C olarak saptandı. Enzim kinetiği çalışmaları ile yabanıl tip CboFDH için format için K_M değeri 2 mM, K_{cat} değeri $9.2 \times 10^2 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 1.5 mM, K_{cat} değeri $2.62 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$; Phe285ThrFDH için format için K_M değeri 0.97 mM ve K_{cat} değeri $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 2.3 mM ve K_{cat} değeri $4.59 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; Val120ThrFDH için format için K_M değeri 1.3 mM ve K_{cat} değeri $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 7.9

mM ve K_{cat} değeri $1.04 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$; Gln287GluFDH için format için K_M değeri 1.65 mM ve K_{cat} değeri $4.42 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 3.3 mM ve K_{cat} değeri $9.51 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; His311GlnFDH için format için K_M değeri 1.5 mM ve K_{cat} değeri $3.28 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 1.6 mM, K_{cat} değeri $8.2 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; Phe285Thr/His311GlnFDH için format için K_M değeri 1.4 mM ve K_{cat} değeri $6.95 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 7 mM, K_{cat} değeri $1.21 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı. Farklı konsantrasyonlardaki 11 farklı metalin enzim aktivitesine etkisi sonuçlarında yabancıl tip CboFDH ve mutant FDH'ler için CuCl_2 harici tüm metallerin aktiviteyi %80'e kadar artırdığı gözlenirken; CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda %77'ye kadar enzim aktivitesini düşürdüğü bulundu. Farklı konsantrasyonlardaki 5 farklı organik çözücünün enzim aktivitesine etkisi sonuçlarında ise yabancıl tip CboFDH ve tüm mutant FDH'lerde aseton, etanol, metanol ve propanolün enzim aktivitesini %20-%31 aralığında artırdığı ancak kloroformun artan konsantrasyonlarda enzim aktivitesini %97'ye kadar düşürdüğü bulundu.

Bu çalışma, bazı patolojik durumlardaki seviyeleri önemli bir belirteç olan formata mutlak spesifik ayrıca endüstriyel kullanım alanları geniş NAD^+ -bağımlı FDH enziminin yerli ve büyük ölçekte üretilebilmesinde veri sağlaması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: *Candida boidinii*, Format Dehidrogenaz, Format, Protein Mühendisliği, Rekombinant DNA Teknolojisi, Termal Stabilite

PRODUCTION OF NAD⁺ DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE ENZYME FROM *Candida boidinii* AND ENHANCEMENT OF ENZYME ACTIVITY AND THERMAL STABILITY

SUMMARY

Enzymes have a broad range of utility in different industries and they are important for biochemical kits used for diagnostics as well. Formate (formic acid) is an essential endogenous single-carbon metabolite under normal circumstances, it is found in human serum and urine at particular levels. Formate levels were shown to increase in human serum, urine and exhaled breathe condensate due to metabolism of different substances especially in cases of methanol intoxication, vitamins B deficiencies, asthma and various psychiatric disorders. Format Dehydrogenase (FDH) is an enzyme that shows absolute specificity for formate and removes electrons from the formate ion in the environment and transfers them to NAD⁺. The amount of NADH + H at the end of the reaction is calculated as a direct proportion to the amount of the formate entering the reaction. With the thesis project, our aim is to produce NAD⁺ dependent FDH enzyme by recombinant DNA technology and increase enzyme activity and thermal stability. In our study, 1095 base pair gene encoding the *Candida boidinii* (Cbo)FDH protein was amplified by PCR using the genomic DNA from *C. boidinii* as a template. The product was cloned into pET-23b(+) vector and transferred to *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells for expression. The affinity His-Trap column was used for purification of the enzyme. Enzyme activity measurements were performed spectrophotometrically by monitoring the formation of NADH at 340 nm. To predict the influence of mutations done on intramolecular interactions, we introduced the available crystal structure (PDB:5DN9) to Gaussian 09 software and was changed the mutation cites. Subsequently, we modelled the structure of amino acid substituted enzyme, into almost real form in its environment by geometrical optimization. The results were visualized by pymol software and discussed. The determined mutations were performed by the directed mutation method for increase the enzyme activity and thermal stability. Kinetic and thermostability studies were performed for both the wild type and mutant FDHs. In this study different metal ions and organic solvents effect on enzyme activity of wild type FDH and mutant FDH strains were investigated as well. The thermal stability assays and secondary structures of the enzymes were performed by circular dichroism(CD) spectroscopy.

According to the results of the study, the optimal pH for wild type CboFDH produced by recombinant DNA technology was 7.4 and optimal temperature was 40°C ; pH and temperatures optimal for mutant enzymes were as follows: Phe285ThrFDH pH 7, temperature 40 °C , Val120ThrFDH pH 7, temperature 40 °C , Gln287GluFDH pH 7, temperature 60 °C, His311GlnFDH pH 7, temperature 65 °C and for the Phe285Thr/His311GlnFDH, pH 8 and the optimal temperature was found to be 65 °C. Thermal denaturation (T_m) temperature values of wild type and mutant enzymes with α -helix secondary structures determined by CD device were determined as 64 °C for wild type CboFDH, 70 °C for Gln287GluFDH, 77 °C for His311GlnFDH and 73 °C for Phe285Thr/His311GlnFDH. Enzyme kinetics studies for wild type CboFDH for formate revealed that the K_M value was 2 mM and K_{cat} value was 9.2 x 10² S⁻¹, for NAD the K_M value was 1.5 mM and K_{cat} was 2.62 x 10⁴ S⁻¹; for Phe285ThrFDH the K_M for formate was 0.97 mM and the K_{cat} value was 6.23 x 10⁶³ S⁻¹, the K_M value for

NAD was 2.3 mM and the K_{cat} value was $4.59 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for Val120ThrFDH the K_M value for formate was 1.3 mM and K_{cat} was $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, K_M value for for the NAD 7.9 mM and K_{cat} of $1.04 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$; for Gln287GluFDH, the K_M value for formate was 1.65 mM and the K_{cat} was $4.42 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 3.3 mM and the K_{cat} value was $9.51 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for His311GlnFDH, the K_M value for the format was 1.5 mM and the K_{cat} was $3.28 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 1.6 mM, the K_{cat} value was $8.2 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for Phe285Thr / His311GlnFDH, the K_M value for the formate was 1.4 mM and the K_{cat} was $6.95 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 7 mM, and the K_{cat} value was $1.21 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$. The effect of 11 different metals in different concentrations on the enzyme activity was found that all metals except CuCl_2 found to enhance the activity for wild type CboFDH and mutant FDHs by up to 80%; CuCl_2 was found to reduce the activity up to 77% in higher concentrations. The effect of 5 different organic solvents in different concentrations on the enzyme activity was found that acetone, ethanol, metanol and propanol increase the activity for wild type CboFDH and mutant FDHs in range between 20%-31% but chloroform was found to decrease the activity between 37%- 97% at increasing concentrations in all enzymes. This study is important in terms of providing data on the production of a wide range of NAD^+ -dependent FDH enzymes, which are absolutely specific to the formate, which is an important indicator of the levels in some pathological conditions, and the production of large-scale NAD^+ -dependent FDH enzyme.

Keywords: *Candida boidinii*, Formate Dehydrogenase, Formate, Protein Engineering, Recombinant DNA Technology, Thermal Stability

**KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE TİMOKİNON VE 5-
FLUOROURACİLİN TERAPOTİK ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kolon kanseri, gelişmiş ülkelerde kadınlarda ve erkeklerde sırasıyla 2 ve 3. sırada yer alan en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Kolon kanserinde rutin tedavi olan 5-Fluorouracil'in (5-FU) %30 başarısı alternatif tedavi yöntemleri arayışına neden olmuştur. Son yıllarda bitkisel kaynaklı doğal etken maddelerin kanser tedavisi üzerinde etkileri yanında konvansiyonel tedavilerle kombine edilmesi ile ilgili araştırmalar yoğunlaşarak sürmektedir.

Bu çalışmada amacımız, rutin tedavide kullanılan 5-FU ile *Nigella sativa*'nın etken maddesi Timokinon'nun (TQ) kolon kanseri üzerine kombine tedavisinin sitotoksik, genotoksik, apoptotik ve anti-kanser etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle araştırılması ve olası etki mekanizmaların aydınlatılmasıdır.

Kolon kanser hücrelerine (LoVo) ilk olarak transfeksiyon ile Lusiferaz geni transfekte edildikten sonra hücre kültürü ortamında farklı konsantrasyonlarda TQ, 5-FU ve kombinasyonlarına maruz bırakıldı. 24 saat inkübasyondan sonra ATP yöntemiyle luminometrik olarak sitotoksisite, comet assay yöntemi ile DNA hasarı, luminometrik yöntem ile hücre içi glutatyon düzeyi, florometrik yöntem ile mitokondriyal membran potansiyeli, akridin turuncusu/etidyum bromür boyası ile floresans mikroskopta apoptoz, *annexin V-FITC* boyası ile akış sitometrisinde apoptoz, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu *western blot* yöntemiyle çalışıldı. Kontrol, TQ, 5-FU ve kombine olmak üzere beş grup *nude* fareye transfekte LoVo hücreleri zenograft yöntem ile subkutan olarak enjekte edildi. 3 hafta sonra oluşturulan tümörlerin tedavisine geçilip, yalnız TQ, yalnız 5-FU ve kombine gruplarına 3 hafta boyunca tedavi uygulandı. Tedavi sonucunda *in vivo* canlı hayvan görüntüleme sistemi ve kumpasla tümör boyutları ölçüldü. Ayrıca tedavi bitiminde alınan kanlarda oksidatif stres ve enflamasyon belirteçleri incelendi. Alınan doku örneklerinde de büyüme faktörleri ve vaskülerizasyon belirteçleri incelendi.

In vitro ortamda LoVo hücreleri üzerinde TQ ve 5-FU ile yapılan tekli terapiye göre kombine terapilerin, tekli tedaviye göre düşük dozlarının sitotoksisiteyi, DNA hasarını, apoptozu ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeylerini arttırırken, mitokondriyal membran potansiyelini ve glutatyon düzeylerini düşürdüğü tespit

edilmiştir. Ayrıca anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonu düşerken apoptotik proteinler Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9, P-53 ve P-21'in protein ekspresyonu artmıştır. Zenografik yöntemle oluşturulan *in vivo* kolon kanserinde ise kombine tedavinin tekli terapilere göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Tümör boyutu küçülürken, dokuda TGFβ1 düzeyi ve vaskülerizasyon belirteci VEGF düzeyleri azalmıştır. Tedavi sonrası alınan plazmalarda pozitif kontrole göre oksidatif stres düzeyleri düşmüştür.

Elde ettiğimiz veriler, rutin tedavide kullanılan 5-FU yanında bitkisel kökenli TQ'nun kombine kullanımının hem *in vitro* hem de *in vivo* oluşturulan kolon kanserinde anti-tümör etkilerini arttırdığını ve tedaviye bağlı yan etkileri azalttığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Timokinon, 5-Fluorourasil, kolon kanseri, IVIS

INVESTIGATION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* THERAPOTIC EFFECT OF THYMOQUINONE AND 5-FLUOROURACIL ON COLON CANCER CELLS

SUMMARY

Cancer is a major public health issue worldwide. In developed countries, colon cancer is the 2nd most common observed type of cancer in women and the 3rd most common in men. The 30% success of 5-FU, which is a routine treatment for colon cancer, has led the researchers to seek different treatment modalities. Therefore, plant-derived natural substances have become the target of a significant amount of attention. In recent years, increasing efforts have been made to discover the effects of combined plant-derived substances with conventional therapy methods on cancer.

This study aimed to investigate the cytotoxic, genotoxic, apoptotic, and anti-cancer effects of thymoquinone – the active ingredient of *Nigella sativa* – and 5-Fluorouracil in combination against *in vitro* and *in vivo* colon cancer while illuminating possible action mechanisms.

Initially, Luciferase transfection was performed in LoVo colon cancer cells to which TQ, 5-FU, and combinations of different concentrations were given, and they were incubated for 24 hours. Luminometric cytotoxicity by ATP method, DNA damage by comet assay, luminometric intracellular glutathione level, fluorometric mitochondrial membrane potential, apoptosis by fluorescence microscopy with acridine orange/ethidium bromide dye, apoptosis in flow cytometry by annexin V-FITC dye, expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins with western blot method have been investigated. Transfected LoVo cells have been injected subcutaneously to five groups of nude mice for the following: control, TQ, 5-FU, and combined. 3 weeks of treatment with TQ, 5-FU, and combined therapy have been initiated 3 weeks after the injection. At the end of this period, tumor size was measured with the IVIS device and caliper. Also, oxidative stress and inflammation markers were examined in blood and growth factors, and vascularization markers were examined in tissue samples at the end of the treatment.

Compared to the monotherapy with TQ and 5-FU on colon cancer, combined treatment has been found in low doses to increase cytotoxicity, DNA damage, apoptosis and intracellular reactive oxygen species in the cell culture studies, while decreasing mitochondrial membrane potential and glutathione levels. Also, the expression of apoptotic proteins Bax, Caspase-3, Caspase-9, p53, and p21 increased while the anti-apoptotic protein Bcl-2 expression decreased. Combination therapy was found to be more effective than mono therapies *in vivo* colon cancer, which was formed by the

xenographic method. While tumor size decreased, TGF β 1 levels and VEGF levels – a vascularization indicator – were decreased in the tissue. In the plasma taken after treatment, oxidative stress levels decreased compared to the positive control group.

According to the data obtained through this study, in colon cancer TQ has been found to increase the anti-tumor properties of the routine therapy of 5-FU *in vitro* and *in vivo* while diminishing the side effects profile.

Keywords: Thymoquinone, 5-Fluorouracil, colon cancer, IVIS

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), alkalin 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*.