

TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI

2021

1. **F*******
K***** Tam Otomatik İzositrat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Kitinin Geliştirilmesi ve İzositrat Dehidrogenaz Enziminin Rekombinant Üretimi
2. **F**** K******* Yeşil Kimya Yöntemiyle Bakır Nanopartiküllerin Oluşturulması, Epigallokateşin ile Kombinasyonun Plga Nano-Taşıyıcılarına Yüklenmesi ve Meme Kanseri Üzerinde Anti-Tümör Etkilerinin İn Vitro ve İn Vivo Araştırılması

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 kullanılacak 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 kullanılacak 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*.

**YEŞİL KİMYA YÖNTEMİYLE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN
OLUŞTURULMASI, EPİGALLOKATEŞİN İLE KOMBİNASYONUN PLGA
NANO-TAŞIYICILARINA YÜKLENMESİ VE MEME KANSERİ
ÜZERİNDE ANTI-TÜMÖR ETKİLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO*
ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Fitokimyasal bileşikler genelde antioksidan özelliğe sahip olmakla birlikte, serbest demir ve bakır varlığında Fenton reaksiyonu gereği pro-oksidan etki gösterdiklerinden kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, fitokimyasalların biyoyararlanımlarının düşük olması, terapötik dozlarının yüksek olması ve selektivitelerinin istenilen düzeyde olmaması kanser tedavisinde kullanımlarını zorlaştırdığından, biyoyarlanımlarını artırıcı, daha düşük dozlarda etkinliğini artırmaya ve hedefe yönelik fitokimyasal tedavi yöntemleri geliştirmeye yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile, metalik serbest bakır ve demir varlığında antioksidan fitokimyasalların, Fenton reaksiyonu olarak bilinen redoks reaksiyonu gereği pro-oksidan etki gösterdikleri, dolayısı ile kanser hücrelerini DNA hasarı yolu ile öldürme potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir. Özellikle bakırın, kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha yüksek konsantrasyonlarda olması, fitokimyasalların kanser hücreleri üzerinde selektivitesini de artırmaktadır. Dolayısı ile hedeflenen fitokimyasal bileşiklerin bakır ile birlikte nano teknolojik yöntemlerle hedef dokuya taşınmasıyla, hem fitokimyasal bileşiğin pro-oksidan etkinliğinin artırılması hem de sağlam dokulara zarar vermeden sadece kanser dokusunda etkili olmasının sağlanması düşünülmüştür. Amacımız, yeşil kimya yöntemi ile oluşturulan bakır nano-partiküllerini yeşil çayda fazla miktarda bulunan ve önemli bir antioksidan fitokimyasal olan epigallokateşin ile birlikte nano-taşıyıcılara yükleyerek epigallokateşinin (EGC) hedef kanser dokusuna taşınması ve anti-tümör etkinliğinin artırılmasıdır. Biyo-sentezlenmiş Cu nano-konjugatlar uzun süre oldukça kararlı ve *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde biyoyumlu olduğu bulunmuştur. Anti-oksidan fitokimyasal olarak EGC kullanılırken, bakır, yeşil kimya yöntemi ile metalik nano-partiküllere dönüştürülmüş ve her ikisi de poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nano misellerinin içine yüklenmiştir. Bunun için, öncelikler *in vitro* ortamda, yeşil kimya ile üretilen nano-bakır ile EGC PLGA nano-partikülünün farklı konsantrasyonlarının meme kanser hücreleri (4T-1) üzerine genotoksik, apoptotik ve sitotoksik etkileri analiz edilecek ve sağlam meme hücreleri ile karşılaştırılmıştır. EGC 'nin IC50'si DMSO ve PLGA-EGC-Cu'da 72 saat

içerisinde sırasıyla $2,89 \text{ mg} \pm 1,8757$; $7,37 \text{ mg} \pm 12,129$ iken, serbest nano bakırın IC50'si $4,70 \text{ mg} \pm 0,3596$ olarak bulunmuştur. PLGA'daki epigallokateşin, DMSO'daki epigallokateşine kıyasla hücrelerin % 50'sinde ölüme neden olabilmesi için daha yüksek bir konsantrasyona ihtiyaç duymuştur. Aynı zamanda PLGA-EGC-Cu formülasyonunun 24 saat içerisinde 4T-1 hücrelerini öldürdüğü, canlı hücrelerin 48 ve 72 saat içerisinde proliferasyona uğradığını göstermektedir. *In vitro* ortamda etkin doz tespit edilmiş, sonrasında aynı kompleks *in vivo* ortamda deney hayvanlarına verilerek anti-tümör etkinliği araştırılmıştır. 4T-1 tümörlü nude farelerde, serbest EGC ve serbest nano bakıra göre PLGA-EGC-Cu kombine tedavi ile en iyi sonuçları vermiştir. Tümör hacmi, tedavi edilmeyen grup, nano Cu, PLGA-EGC-Cu ve PLGA-EGC tedavi grupları ile karşılaştırıldığında yaklaşık 15 kat, 3,5 kat ve 2.86 kat azalmıştır. PLGA nano taşıyıcısı FITC işaretli olacağından, farelere uygulanan nanopartikülerin tümörde tutulumu IVIS görüntüleme cihazı ile takip edilebilmiştir. Böylece, hem fitokimyasalın pro-oksidan etkisi artırılarak tümör hücreleri üzerine daha düşük dozlarda etkili olması, hem de kanser dokusuna yoğunlaştığından sağlam hücrelere zarar vermesi önlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Doğal Antioksidanlar, Hedefli Kanser Tedavisi, Bakır, ROS, Pro-oksidan , Kombin Terapi ,Yeşil Kimya

**PRODUCTION OF COPPER NANOPARTICLES BY THE GREEN
CHEMISTRY METHOD, LOADING OF EPIGALLOCATECHIN
COMBINATION ON PLGA NANO-CARRIERS AND INVESTIGATION OF
THEIR *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTI-TUMOR EFFECTS ON BREAST
CANCER**

SUMMARY

Although phytochemical compounds generally have antioxidant properties, they are used in cancer treatment because they show pro-oxidant effect due to Fenton reaction in the presence of free iron and copper ions. However, since the bioavailability of phytochemicals is low, their therapeutic doses are high and their selectivity is not at the desired level, making it difficult to use them in cancer treatment, studies to increase their bioadjectivity, increase their effectiveness at lower doses and develop targeted phytochemical treatment methods have recently gained importance. In recent studies, it has been shown that antioxidant phytochemicals in the presence of metallic free copper and iron have a pro-oxidant effect due to the redox reaction known as the Fenton reaction, and thus have the potential to kill cancer cells by DNA damage. In particular, the fact that copper is at higher concentrations in cancer cells than normal cells increases the selectivity of phytochemicals on cancer cells. Therefore, by transporting the targeted phytochemical compounds together with copper to the target tissue by nano-technological methods, it has been thought to increase the pro-oxidant activity of the phytochemical compound and to ensure that it is effective only in cancer tissue without damaging healthy tissues. Our aim is to transfer the epigallocatechin (EGC) to the target cancer tissue by loading the copper nanoparticles formed by green chemistry method with epigallocatechin, which is an important antioxidant phytochemical in green tea, to the target cancer tissue and to increase the anti-tumor activity. Bio-synthesized Cu nano-conjugates have long been found to be highly stable and biocompatible in *in vitro* and *in vivo* systems. While EGC was used as anti-oxidant phytochemical, copper was transformed into metallic nanoparticles by green chemistry method and both were loaded into poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanomelles. For this purpose, the genotoxic, apoptotic and cytotoxic effects of different concentrations of nano-copper produced with green chemistry and EGC PLGA nanoparticle on breast cancer cells (4T-1) will be analyzed and compared with intact breast cells. The IC₅₀ of EGC was 2.89 mg ± 1.8757 in DMSO and PLGA-EGC-Cu within

72 hours, respectively; While it was $7.37 \text{ mg} \pm 12,129$, the IC50 of free nano copper was found to be $4.70 \text{ mg} \pm 0.3596$. Epigallocatechin in PLGA required a higher concentration to cause death in 50% of cells compared to epigallocatechin in DMSO. It also shows that the PLGA-EGC-Cu formulation kills 4T-1 cells within 24 hours, and living cells proliferate within 48 and 72 hours. The effective dose was determined in vitro, and then the same complex was given to experimental animals in vivo to investigate anti-tumor activity. In nude mice with 4T-1 tumors, PLGA-EGC-Cu combined treatment yielded the best results compared to free EGC and free nanofiber. Tumor volume was reduced approximately 15-fold, 3.5-fold, and 2.86-fold compared to the untreated group, nano Cu, PLGA-EGC-Cu, and PLGA-EGC treatment groups. Since the PLGA nanocarrier will be FITC labeled, the uptake of the nanoparticles

applied to mice in the tumor could be followed by an IVIS imaging device. Thus, the pro-oxidant effect of the phytochemical was prevented from being effective on tumor cells at lower doses and damaging intact cells as it concentrated on cancer tissue.

Keywords: Natural Antioxidants, Targeted Cancer Therapy, Copper, ROS, Pro-oxidant, Combination Therapy, Green Chemistry