BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

DOKTORA TEZİ

Fatmanur KÖKTAŞOĞLU

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahabettin SELEK

ŞUBAT 2021

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

DOKTORA TEZİ

Fatmanur KÖKTAŞOĞLU
(160606001)

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahabettin SELEK
Eş Danışman: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

ŞUBAT 2021

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 160606001 numaralı Doktora öğrencisi, "Fatmanur KÖKTAŞOĞLU", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "TAM OTOMATİK İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÖLÇÜM KİTİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT ÜRETİMİ" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı :	**Prof. Dr. Şahabettin SELEK** Bezmialem Vakıf Üniversitesi	.....
Eş Danışman :	**Prof.Dr. Fahri AKBAŞ** Bezmialem Vakıf Üniversitesi	.....
Jüri Üyeleri :	**Prof. Dr. İsmail MERAL** Bezmialem Vakıf Üniversitesi	.....
	Prof. Dr. Ebru KALE Sağlık Bilimleri Üniversitesi	.....
	Dr. Öğr. Üyesi Emine Rümeysa HEKİMOĞLU Bezmialem Vakıf Üniversitesi	.....
	Dr. Öğr. Üyesi Hifa Gülru ÇAĞLAR Sağlık Bilimleri Üniversitesi	.....

Teslim Tarihi : 24 Mart 2021
Savunma Tarihi : 10 Şubat 2021

Eşime,

ÖNSÖZ

Öncelikle bugünlere gelmemi sağlayan, yoğun öğrencilik ve çalışma hayatım sırasında maddi-manevi hiçbir desteğini esirgemeyen annelerim Naciye YILMAZ ve Hüsniye KÖKTAŞOĞLU'na; hayatımın her alanında desteği ve sevgisini eksik etmeyen, yolumu aydınlatan eşime, moral ve motivasyon kazanmamı sağlayarak içimi huzurla dolduran ve ferahlatan miniklerim Nur ve Semih'e, ilim yolunda attığım her adımda bana destek olan kardeşlerime, ve elini omzumdan hiç eksik etmeyen dostum Dr. Hifa Gülru ÇAĞLAR'a gönülden teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında fikir ve emekleriyle yardımlarını esirgemeyen, çalışkanlığı, bilime yaptığı hizmetler ve topluma sağladığı katkılarıyla her zaman örnek kabul ettiğim danışmanım Prof. Dr. Şahabettin SELEK'e; çalışmamın her aşamasında danışabildiğim, bilgisi ve tevazusuyla örnek aldığım eş danışmanım Prof. Dr. Fahri AKBAŞ'a, maddi manevi fikirlerinden istifade ettiğim, gayreti ve bilimsel cesareti ve çalışmalarıyla örnek aldığım anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın en sıkıcı kısımlarını yardımları ve destekleriyle neşe ve huzurla geçirmemi sağlayan çalışma arkadaşlarım Alime SARIKAYA, Metin DEMİREL, Dr. Ayşe Zehra KARADERE ve Dr. Tuğçe YILDIZ'a; hem hocam hem arkadaşım olarak Dr. Vildan Betül YENİGÜN'e, araştırma laboratuvarımızın babacan çalışanı abimiz Mustafa KARABONCUK'a, verdiği moral ve destek için arkadaşım Şeyma CEYLAN'a teşekkür ederim.

Çalışmamın gizli kahramanlarından olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nın güleryüzlü, vefakar ve fedakar çalışanları başta Sevgi KIRMIZI, Muammer DARÇIN, Tağı POLAT, Derya DEVRAN ve Ayşe KARADAĞ olmak üzere, tüm çalışanlarına sabır ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

11.2018/18 no'lu proje ile çalışmaya verdiği destek için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine ve yardım ve destekleri için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne teşekkür ederim.

Şubat 2021 Fatmanur Köktaşoğlu

(Doktor)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Fatmanur Köktaşoğlu

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ... **iv**
BEYAN ... **v**
İÇİNDEKİLER ... **vi**
KISALTMALAR ... **ix**
SEMBOLLER ... **x**
TABLO LİSTESİ ... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ... **xiii**
ÖZET ... **xv**
SUMMARY ... **xvii**
1. GİRİŞ VE AMAÇ ... **1**
2. GENEL BİLGİLER ... **3**
2.1 İzositrat Dehidrogenaz Enzimi ... 3
2.1.1 Metabolizmada İzositrat Dehidrogenaz Enzimi ... 3
2.1.2 İzositrat dehidrogenaz enzimi ve kanser ... 5
2.1.2.1 IDH mutasyonunda kanserin moleküler mekanizması ... 6
2.1.2.2 (D)-2-hidroksiglutarat molekülünün özellikleri ... 8
2.1.2.3 IDH mutasyonunun uzun dönem etkileri ... 10
2.1.2.4 IDH mutasyonu tespit yöntemleri ... 11
2.1.3 İzositrat dehidrogenaz 3 enzimi ... 13
2.1.4 Normal tip $NADP^+$-bağımlı IDH enzimi ve klinikte kullanımı ... 15
2.2 Spektrofotometrik ölçüm ... 16
2.2.1 Enzim Aktivitesi Ölçümü ... 18
2.2.2 Metodun geçerli kılınması ... 20
2.3 Rekombinant Enzim Üretimi ... 21
2.3.1 Rekombinant üretimde en sık kullanılan mikroorganizmalar ... 23
2.3.2 Vektöryel sistem seçimi ... 25
3. GEREÇ VE YÖNTEM ... **26**
3.1 Gereç ... 26
3.1.1 Cihazlar ... 26
3.1.2 Kimyasallar ... 27
3.1.3 Ticari kitler ve enzimler ... 28
3.1.4 Mikroorganizmalar ... 29
3.1.5 Primerler ... 29
3.1.6 Vektör sistemleri ... 30
3.1.7 DNA ve protein markırları ... 32
3.1.8 Hazırlanan besiyerleri ve diğer özellikli solüsyonlar ... 32
3.2 Yöntem ... 35
3.2.1 Rekombinant $NADP^+$- bağımlı enzimlerin üretimi ... 35
3.2.1.1 Genetik kodun temini ve genetik kodu barındıran mikroorganizmanın büyütülmesi ... 35
3.2.1.2 Genetik kodu içeren vektör sisteminin pürifikasyonu ... 35

3.2.1.3 $NADP^+$-bağımlı R132H Mutant ve normal IDH1 genlerinin çoğaltılması için primer tasarımı 36
3.2.1.4 Genetik kodun taşıyıcı vektöre aktarımı 38
3.2.1.5 *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerine transformasyonu 40
3.2.1.6 pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/IDH1-R132H plazmid pürifikasyonu.. 42
3.2.1.7 pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin kontrol edilmesi 43
3.2.1.8 pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin *Pichia Pastoris*'e transformasyonu 43
3.2.1.9 Protein Ekspresyonunun İndüksiyonu 47
3.2.1.10 Üretilen enzimlerin stabilite testleri için depo edilmesi 47
3.2.2 Rekombinant NAD^+-bağımlı enzimin üretimi 47
3.2.2.1 Genetik kodun temini 47
3.2.2.2 NAD^+ - bağımlı IDH genetik kodunun pET-28b(+) vektörüne aktarılması 49
3.2.2.3 Rekombinant pET28b/SpIDH plazmidinin çoğaltılması 50
3.2.2.4 Rekombinant pET28b / NAD^+ - SpIDH plazmidinin ekspresyon konağına aktarılması 51
3.2.2.5 Klonlanan NAD^+-SpIDH enziminin pürifikasyonu 52
3.2.2.6 Üretilen enzimin stabilite testleri için depo edilmesi 53
3.2.2.7 SDS-PAGE analizi 53
3.2.2.8 Rekombinant üretilen NAD^+-SpIDH, $NADP^+$-bağımlı normal ve $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH enzimlerinin aktivite çalışmaları 54
3.2.3 Metot geliştirme 59
3.2.3.1 Enzimatik metodun prensibi 60
3.2.3.2 $NADP^+$-bağımlı normal IDH1 enzim aktivitesi ölçüm metodu geliştirme çalışmaları 61
3.2.3.3 $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enzim aktivitesi ölçümü için yapılan çalışmalar 64
3.2.3.4 Sürfaktan madde çalışmaları 68
3.2.3.5 Yöntemin geçerli kılınması ve performans değerlendirmeleri 68
4. BULGULAR 72
4.1 Rekombinant Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar 72
4.1.1 Genetik kodu içeren vektör sisteminin çoğaltılma ve pürifikasyon bulguları 72
4.1.2 Genetik kodun pPICZα-A taşıyıcı vektörüne aktarımı bulguları 72
4.1.3 Ligasyon ürününün kompetan hücrelerde çoğaltılması bulguları 72
4.1.4 Protein miktar tayini bulguları 74
4.1.5 SDS-PAGE analizi görüntüleme bulguları 74
4.1.6 Enzim kinetiği çalışmaları 75
4.1.6.1 Rekombinant $NADP^+$- bağımlı normal IDH enzim kinetiği 75
4.1.6.2 Rekombinant NAD^+- bağımlı IDH enzim kinetiği 77
4.1.7 Rekombinant üretilen enzimlerin stabilite değerlendirmeleri 77
4.1.7.1 NAD^+-bağımlı IDH 77
4.1.7.2 $NADP^+$-bağımlı IDH 78
4.2 Metot Geliştirme Bulguları 79
4.2.1 Manuel spektrofotometre çalışma bulguları 79
4.2.1.1 $NADP^+$ - bağımlı normal IDH enzim aktivitesi ölçüm metodu çalışmaları bulguları 79

4.2.1.2 $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH aktivite ölçüm metodu çalışma bulguları..... 84
4.2.2 Otomatik kimya analizörü üzerinde çalışma bulguları 85
4.2.2.1 $NADP^+$-bağımlı IDH enzimi aktivite ölçüm çalışmaları 85
4.2.2.2 Hasta ve sağlıklı insan serumları üzerinde çalışma bulguları 85
4.2.2.3 Sürfaktan madde çalışma bulguları 86
4.2.2.4 $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH aktivite ölçümü için yapılan çalışma bulguları 88
4.2.3 Geliştirilen $NADP^+$-bağımlı IDH aktivite ölçüm kitinin stabilite değerlendirmesi 88
4.2.4 Metotun geçerli kılınması 88
4.2.4.1 Kesinlik değerlendirmesi 88
4.2.4.2 Analitik sensitivite (LoB) hesaplama bulguları 91
4.2.4.3 Linearite değerlendirmeleri 92
5. TARTIŞMA 95
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 104
KAYNAKLAR 106
EKLER 118
ÖZGEÇMİŞ 123

KISALTMALAR

α-KG : α-ketoglutarat
(D)-2HG : (D)-2-hidroksiglutarat
ALP : Alkalen fosfataz
ALT : Alanin aminotransferaz
AOX1 : Alkol Oksidaz
AST : Aspartat amino transferaz
ATP : Adenozin trifosfat
CRM : Sertifikalı Referans Matertal
CV : Varyasyon katsayısı
D2HGD : (D)-2-hidroksiglutarat dehidrogenaz enzimi
DNA : Deoksiribonükleik asit
GBM : Glioblastome Multiforme
GFP : Green floresan protein
GGT : γ -glutamil transferaz
IDH : İzositrat dehidrogenaz
IPTG : İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
L2HGD : (L)-2-hidroksiglutarat dehidrogenaz enzimi
LB : Luria-Bertani
LoB : Ölçülebilir en düşük kör seviyesi
NADH+H : Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH+H : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMDA : N-Metil-D-aspartik asit
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA : Ribonükleik asit
RPM : Revolutions per minute
UV : Ultraviole
UV-vis : Ultraviole görünür ışık
YPD : Yeast Extract–Peptone–Dextrose

SEMBOLLER

^{o}C **:** Derece santigrat
$C_2H_3NaO_2$ **:** Sodyum asetat
$CaCl_2$ **:** Kalsiyum klorür
CO_2 **:** Karbondioksit
K_2HPO_4 **:** Potasyum fosfat
KCl **:** Potasyum klorür
L **:** Litre
LiCl **:** Lityum klorid
M **:** Molar
$MgCl_2$ **:** Magnezyum Klorür
$MgSO_4$ **:** Magnezyum Sülfat
ml **:** Mililitre
mM **:** Milimolar
$MnCl_2$ **:** Mangan klorür
$MnSO_4$ **:** Mangan sülfat
$NaSO_4$ **:** Sodyum sülfat
Nm **:** Nanometre
µg **:** Mikrogram
Ml **:** Mikrolitre
µM **:** Mikromolar
U **:** Enzim ünitesi

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Klinikte yaygın kullanımı olan enzimler.....19
Tablo 3.1 : Kullanılan cihazlar ve markaları..... 26
Tablo 3.2 : Kullanılan kimyasallar ve markaları..... 27
Tablo 3.3 : Kullanılan ticari kitler ve enzimler. 29
Tablo 3.4 : Normal ve R132H mutant IDH genomik DNA kalıplı PCR karışımı bileşenleri. 37
Tablo 3.5 : Normal ve R132H mutant IDH genomik DNA kalıplı PCR işlemi koşulları.....37
Tablo 3.6 : pPICZα-A vektörü ve PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi 38
Tablo 3.7 : PICZα-A vektörü ve normal ve R132H mutant $NADP^+$- IDH1 PCR ürünlerinin ligasyonu..... 40
Tablo 3.8 : pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/IDH1-R132H vektörleri için koloni PCR miktarları 41
Tablo 3.9 : pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/IDH1-R132H vektörleri için koloni PCR koşulları..... 41
Tablo 3.10 : pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin kesilmesi. 43
Tablo 3.11 : Transformasyon bileşenleri. 45
Tablo 3.12 : Maya lizat tamponu bileşenleri..... 45
Tablo 3.13 : *Pichia pastoris* koloni PCR bileşenleri..... 46
Tablo 3.14 : *Pichia pastoris* koloni PCR koşulları. 47
Tablo 3.15 : *S. putrefaciens* PCR bileşenleri 48
Tablo 3.16 : *S. putrefaciens* PCR koşulları 48
Tablo 3.17 : Ekspresyon plazmidi ve PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi..... 49
Tablo 3.18 : PCR ürünü / pET-28b(+) vektörü ligasyon işlemi bileşenleri. 49
Tablo 3.19 : *E. coli* hücreleri lizis tamponu bileşenleri 52
Tablo 3.20 : SDS-PAGE analizi için hazırlanan jellerin içeriği 53
Tablo 3.21 : $NADP^+$-bağımlı IDH enzim kinetiği için farklı konsantrasyonlarda substrat ile hazırlanan reaksiyon ortamları..... 58
Tablo 3.22 : $NADP^+$ - bağımlı R132H mutant IDH1 enzim kinetiği için farklı konsantrasyonlarda substrat ile hazırlanan reaksiyon ortamları..... 59
Tablo 3.23 : NAD^+- bağımlı IDH enzim kinetiği için farklı konsantrasyonlarda substrat ile hazırlanan reaksiyon ortamları..... 59
Tablo 3.24 : Enzim aktivite tayininde kullanılan tamponlar..... 60
Tablo 3.25 : Deneylerde kullanılan reaksiyon bileşenleri ve kullanım amacı. 61
Tablo 3.26 : $NADP^+$-bağımlı normal IDH1 enzim aktivitesi için tek reaktifli oto-analizör numune-reaktif hacimleri. 63
Tablo 3.27 : Manuel spektrofotometrede çalışılan reaktif ve numune miktarları.64

Tablo 3.28 : $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH enzim aktivitesi ölçümü için II. basamak manuel spektrofotometre çalışmaları 64
Tablo 3.29 : $NADP^+$ - bağımlı R132H mutant IDH1 enzim aktivitesini ölçmeye yönelik oto-analizör üzerinde kulanılan reaktifler ve kullanılan hacimler. 67
Tablo 4.1 : Nano-drop ile DNA ölçüm souçları 72
Tablo 4.2 : Ligasyon ürünlerinin nano-drop spektrofotometre okuma sonuçları .. 73
Tablo 4.3 : Reaktif-numune miktarını belirlemek için yapılan deney sonuçları 75
Tablo 4.4 : Rekombinant $NADP^+$-bağımlı normal IDH enzim kinetiği değerleri. 77
Tablo 4.5 : Rekombinant NAD^+-bağımlı IDH enzim kinetiği değerleri 77
Tablo 4.6 : Yüksek ALT aktivitesine sahip hasta serumları ile $NADP^+$-bağımlı IDH aktivitesi karşılaştırması 86
Tablo 4.7 : Çalışılan sürfaktanlar ve elde edilen bulgular 86
Tablo 4.8 : $NADP^+$-bağımlı normal IDH aktivitesi ölçüm kitine koruyucu olarak eklenen kimyasallar. 88
Tablo 4.9 : Kesinlik hesaplamaları 90
Tablo 4.10 : Düşük seviye serum örneğiyle yapılan kesinlik değerlendirmesi istatistik sonuçları .....
Tablo 4.11 : Yüksek seviye serum örneğiyle yapılan kesinlik değerlendirmesi istatistik sonuçları 91
Tablo 4.12 : LoB değerlendirme bulguları 92
Tablo 4.13 : $NADP^+$-bağımlı normal IDH-1 aktivite ölçüm kitinin stabilite çalışma bulguları 94
Tablo 5.1 : Farklı çalışmalarda üretilen rekombinant $NADP^+$-bağımlı IDH K_M değerleri 100
Tablo 5.2 : İzole edilen NAD^+-bağımlı IDH enzimleri ve K_M değerleri 101

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : $NADP^+$-bağımlı izositrat dehidrogenaz-1 enziminin protein yapısı 3
Şekil 2.2 : Hücresel IDH1 ve IDH2 enzim reaksiyonları 4
Şekil 2.3 : $NADP^+$-bağımlı IDH normal ve R132H mutant sekansı. 6
Şekil 2.4 : IDH1/2 enzimleri mutasyonu sonucu meydana gelebilecek dimer yapılar. 7
Şekil 2.5 : Normal ve mutant tip IDH enzimlerinin dimerik yapısı ve aktivitesi. 7
Şekil 2.6 : 2-hidroksiglutarat molekülünün D- ve L- enantiyomerleri. 8
Şekil 2.7 : IDH mutasyonu sonucu kanser gelişiminin moleküler mekanizması. .. 10
Şekil 2.8 : DSÖ grade II astrositoma ve astrositosiz dokularının immünohistokimyasal boyama örneği. 12
Şekil 2.9 : Trikarboksilik asit siklüsü. 14
Şekil 2.10 : Karaciğer lobül görüntüsü üzerinde zonların gösterimi 16
Şekil 2.11 : Reaksiyon sırasında artan ve azalan bileşenler 18
Şekil 2.12 : $NADP^+$, NADPH ve NAD^+, NADH moleküllerinin kimyasal gösterimi 18
Şekil 2.13 : $NAD(P)^+$ ve NAD(P)H moleküllerinin absorbans spektrumu 19
Şekil 2.14 : İzositrat dehidrogenaz enzimi reaksiyonu 20
Şekil 2.15 : Klonlamanın ana basamakları 22
Şekil 3.1 : pSLIK-IDH1-FLAG vektör haritası. 30
Şekil 3.2 : pSLIK-IDH1-R132H-FLAG vektör haritası. 31
Şekil 3.3 : pPICZα-A vektörü haritası. 31
Şekil 3.4 : DNA Markırı 32
Şekil 3.5 : Protein Markırı 32
Şekil 3.6 : $NADP^+$-IDH genetik kodu. 36
Şekil 3.7 : Enzim konsantrasyonu – reaksiyon hızı ilişkisi..... 54
Şekil 3.8 : Michaelis-Menten eğrisi..... 55
Şekil 3.9 : Lineweaver–Burk Eğrisi..... 56
Şekil 3.10 : Enzim aktivitesi – ısı ilişkisi 57
Şekil 4.1 : PCR koloni görüntüleme bulguları. 73
Şekil 4.2 : pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerini alan hücrelerin doğrulanması için yapılan PCR görüntüleme bulguları. 74
Şekil 4.3 : Rekombinant NAD^+-SpIDH SDS-PAGE analizi. 75
Şekil 4.4 : Rekombinant $NADP^+$- bağımlı IDH enzimine ait Michaelis-Menten Eğrisi. 76
Şekil 4.5 : Rekombinant $NADP^+$- bağımlı IDH enzimine ait Lineveawer Burk grafiği. 76
Şekil 4.6 : Rekombinant NAD^+-bağımlı IDH Linewear-Burk grafiği. 77
Şekil 4.7 : NAD^+-bağımlı IDH enzimin stabilite değerlendirmeleri. 78
Şekil 4.8 : $NADP^+$-bağımlı IDH enzimin stabilite değerlendirmeleri.78
Şekil 4.9 : Farklı tampon ortamlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisi. 79
Şekil 4.10 : Tris tamponunda $NADP^+$-IDH enzim aktivite çalışmaları..... 79

Şekil 4.11 : İzositrat konsantrasyonunun $NADP^+$-IDH aktivitesine etkisi. 80
Şekil 4.12 : $NADP^+$ konsantrasyonunun $NADP^+$-IDH aktivitesine etkisi..... 81
Şekil 4.13 : Farklı kofaktörlerin $NADP^+$-IDH aktivitesi üzerinde etkisi..... 81
Şekil 4.14 : $MgSO_4$ konsatrasyonunun $NADP^+$-IDH aktivitesi üzerinde etkisi. 82
Şekil 4.15 : 50 mM konsantrasyonda farklı kimyasalların aktivite ölçümüne etkisi. 83
Şekil 4.16 : [KCl] - $NADP^+$-IDH aktivitesi. 83
Şekil 4.17 : R132H mutant IDH enzimi ile manuel spektrofotometrede çalışılan NADPH için zaman-absorbans grafiği. 84
Şekil 4.18 : Oto-analizör üzerinde serum ve $NADP^+$-bağımlı enzimlerin okuma grafikleri 86
Şekil 4.19 : Farklı sürfaktan maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi. 87
Şekil 4.20 : Farklı konsantrasyonlarda gliserolün $NADP^+$- IDH enzim aktivitesi üzerine etkisi. 87
Şekil 4.21 : Normal NADP-bağımlı IDH ölçüm kiti linearite grafiği. 93
Şekil 4.22 : IDH = 2625 olarak ölçülen numune absorbans grafiği 93
Şekil 5.1 : Akonitaz enziminin katalizlediği reaksiyon. 102
Şekil 5.2 : TCA siklüsünün 3. basamağı olan IDH enzimi reaksiyonu. 102

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) üetimini 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 hücresel 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 hücresel 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 kullanlan 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 kullanılabilecek 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 kullanılabilecek mutant ve normal form $NADP^+$-bağımlı IDH enzimilerinin 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 DEHIDROGENASE 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 μM / min and 108 μM, respectively.

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

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İzositrat dehidrogenaz (IDH) enzimi izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu sağlayarak α-ketoglutarat (α-KG) ve karbondioksit (CO_2) üetimini katalizleyen bir enzimdir. İnsan vücudunda IDH1, IDH2 ve IDH3 olmak üzere 3 farklı IDH enzimi bulunur. Bunlardan IDH1 sitozol ve peroksizomlarda, IDH2 ve IDH3 mitokondride aktivite göstermektedir [1]. IDH1 ve IDH2 enzimleri koenzim olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ($NADP^+$) kullanırken, IDH3 enzimi aynı (NAD^+) kullanarak gerçekleştirir. IDH1 ve IDH 2 enzimlerinin metabolizmada NADPH+H kaynağı olarak görev yapmasının yanında glukoz, yağ asidi ve glutamin metabolizmasında rolü olduğu bilinmektedir [2]. Aynı zamanda klinik olarak karaciğer dokusuna özgüllüğünün yüksek, karaciğer doku harabiyeti durumlarında serumdaki artışının oldukça hassas bir gösterge olduğu kabul edilir [3]. 2008 yılında oldukça ses getiren bir çalışma ile bir santral sinir sistemi malinitesi olan gliomalı hastaların tümör doku örneklerinde yapılan genetik incelemede IDH1 genetik koduna ait mutasyonların sık tekrar edildiği gösterilmiştir. IDH1 protein sekans sıralamasında 132. aminoasit olan arjinin histidin ile yer değiştirdiği R132H mutasyonu en sık kaşılaşılan mutasyon olarak belirtilmiştir [4]. Daha sonra geniş çaplı çalışmalar ile bu mutasyon varlığının hastalığın seyrini değiştirebileceği ve uygulanacak tedavi yaklaşımını etkileyebileceği gösterilmiştir. Bunun sonucunda 2016 yılında bu mutasyonun varlığı Dünya Sağlık Örgütünün santral sinir sistemi tümörleri sınıflamasında kullanılmaya başlanmıştır [5]. Enzimin genetik kodunda gerçekleşen mutasyonun reaksiyonun substratı olan izositratın bağlanma bölgelerinde değişiklik yaparak normalde ürün olarak ortaya çıkan α-KG molekülünün substrat olarak kullanılmasına ve (D)-2-hidroksiglutarat molekülünün üretilmesine sebep olduğu bildirilmiştir [6]. 5 karbonlu bir kasrboksilik asit türevi olan bu molekülün hücrelerde epigenetik değişikliklere yol açarak kanser gelişimine yol açtığı düşünülmektedir [7]. IDH mutasyonlarına gliomalardan başka akut myeloid lösemi, kolanjiyokarsinoma, kondrosarkoma, anjio immünoblastik lenfoma gibi santral sinir sistemi dışındaki tömörlerde de oldukça sık rastlandığı gösterilmiştir [8]. IDH1 mutasyonunun bu kanserlerde erken olay olabileceği bilgisi literatürde yer almaktadır [9].

Metabolik olarak büyük öneme sahip IDH1 mutasyonunun erken tespit edilebilir olması büyük önem arz etmektedir. Sanger sekanslama, immünohistokimya gibi IDH mutasyonunu tespit edebilmek için hali hazırda kullanılan yöntemler tümör doku örneklerinde çalışılan tekniklerdir [10]. Uygulaması maliyetli ve cerrahi girişim gerektiren bu tekniklerin basite indirgenebilmesi için çalışmalar yapılmaktadır.

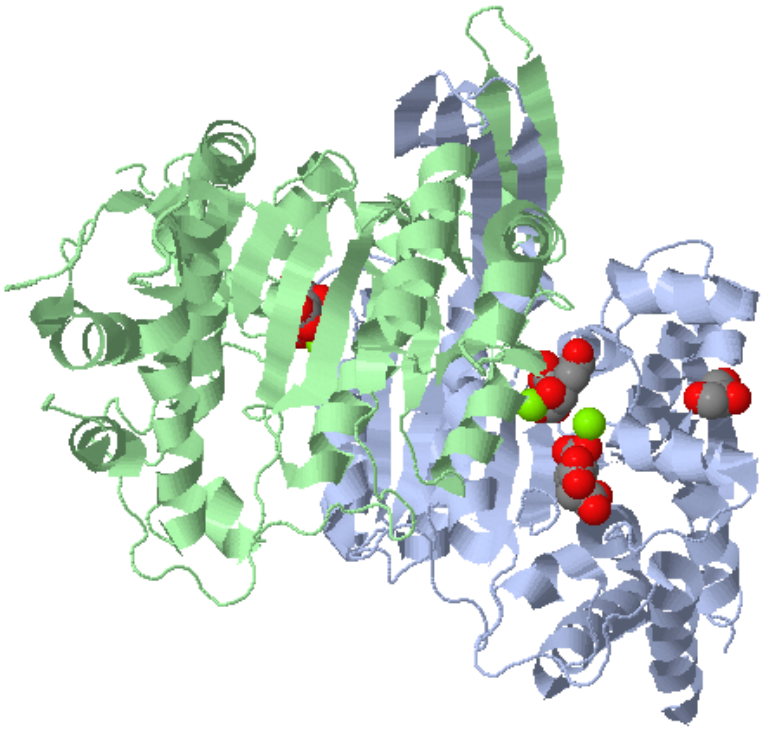
Çalışmamızda tüm rutin biyokimya laboratuvarlarında kullanılan otomatik kimya analizörüne uyumlu, büyük girişim gerektirmeden alınabilecek basit serum örnekleriyle çalışılabilecek kitlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Karaciğer parankim harabiyetinin en hassas göstergesi olarak kabul edilen $NADP^+$-bağımlı IDH enzim aktivitesinin ölçümünü ve beyin kanserlerinin çok erken evresinde meydana gelen $NADP^+$-bağımlı IDH mutasyonlarının tesbitini serumdan gerçekleşetirebilecek kitler üzerinde çalışılmıştır. Geliştirilecek kitlerin kalibrasyonu ve kontrolleri için gerekli IDH enzimlerinin rekombinant olarak üretilmesi; ölçüm metotlarının performans ve stabilite değerlendirmelerinin uluslararası standartlara uygun olarak gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Klonlanan rekombinant enzimlerin kinetik ve biyokimyasal özellikleri karakterize edilerek farklı çalışmalarda elde edilmiş aynı enzimin özellikleriyle karşılaştırılacaktır. Çalışmanın olumlu sonuç vermesi halinde hem mutant hem de mutant olmayan (normal) $NADP^+$-bağımlı IDH1 enziminin aktivite ölçümünü mümkün kılan basit, ucuz ve standardize teknikler geliştirilmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İzositrat Dehidrogenaz Enzimi

2.1.1 Metabolizmada İzositrat Dehidrogenaz Enzimi

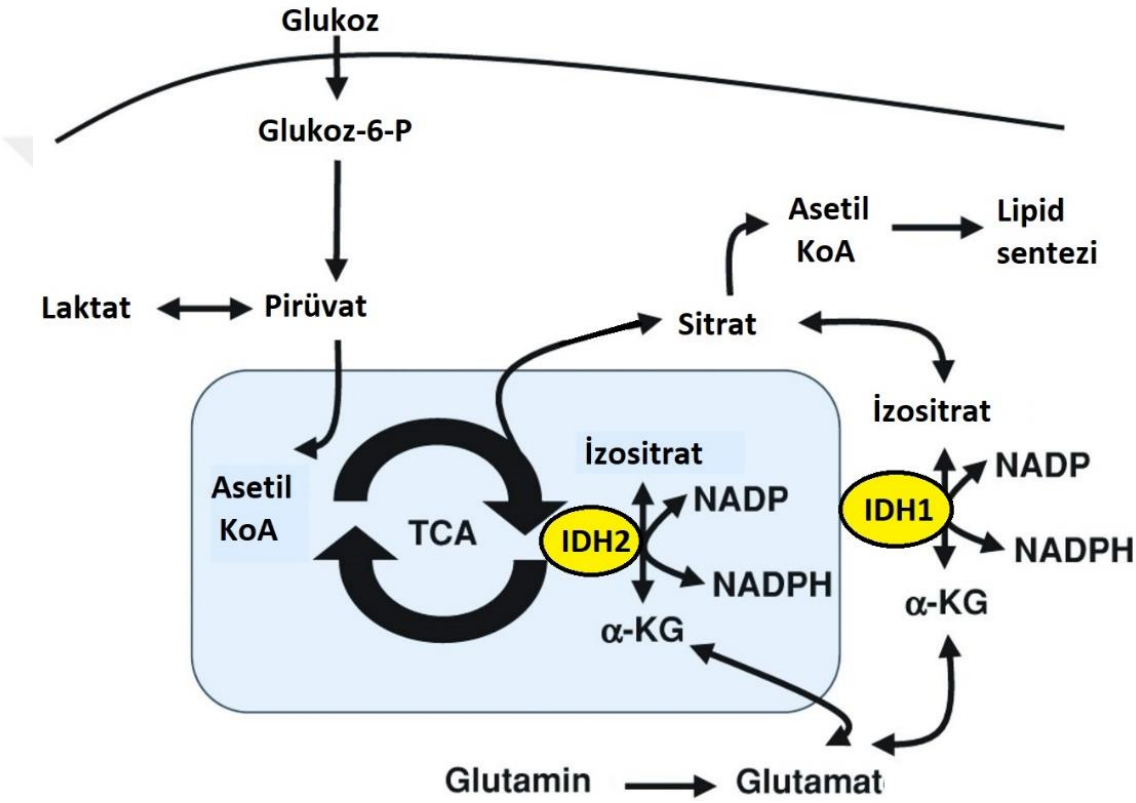
İzositrat dehidrogenaz (IDH) enzimi izositrat molekülünün CO_2 üreterek α-ketoglutarik aside (α-KG) dönüşümünü katalize eden biyolojik bir enzimdir. Sitozol, peroksizom ve mitokondride gerçekleşen bu reaksiyonda enzim kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ($NADP^+$) molekülüne ihtiyaç duyar. İnsan IDH'lerini kodlayan beş gen tanımlanmıştır. Sitozol ve peroksizomlarda 2q33.3 üzerinde IDH1 geni tarafından kodlanan IDH1 (Şekil 2.1), $NADP^+$ 'dan NADPH üretmek için izositratın (ICT) α-ketoglutarata (α-KG) oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder.



Şekil 2.1: $NADP^+$-bağımlı izositrat dehidrogenaz-1 enziminin protein yapısı [11].

15q26.1'de IDH2 geni tarafından kodlanan IDH2 aynı reaksiyonu mitokondri içinde gerçekleştirir[12]. Hem IDH1 hem de IDH2 (E.C. 1.1.1.42) homodimer olarak işlev

görür ve aralarında yüksek derecede sekansal ve yapısal benzerlik bulunur [13]. Her iki izoformun ileri oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonu yoluyla oksidatif hasara karşı hücresel savunmada; bir NADPH kaynağı olarak indirgeyici biyosentez reaksiyonlarında ve α-KG üreterek bu molekülü ko-subtrat olarak kullanan dioksijenaz enzim fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir [14-16]. Aynı zamanda tersinir işlev görebilen bu 2 izoform enzim akonitaz enzimi ile birlikte sitrat kaynağı olarak lipogenez ve glikoliz regülasyonu dâhil olmak üzere çeşitli hücresel işlevlerde görev yapmaktadır [17].



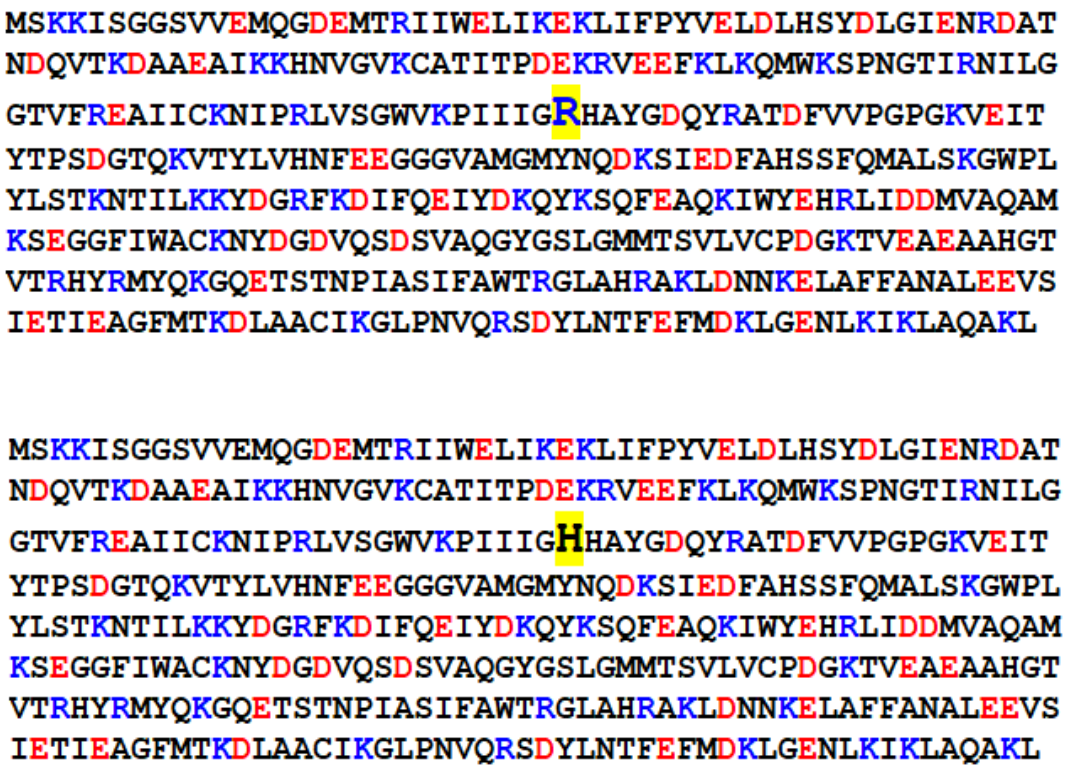
Şekil 2.2: Hücresel IDH1 ve IDH2 enzim reaksiyonları [18].

IDH1 ve 2'nin ters indirgeyici karboksilasyon reaksiyonu hücre için ileri oksidatif dekarboksilasyon kadar önemlidir (Şekil 2.2). Sitozolde IDH1, mitokondri içinde ise IDH2 tarafından ters indirgeyici karboksilasyon reaksiyonu sitrat kaynağı olarak görev yapar [9]. Mitokondri içerisinde NADH - NADPH dönüşümünü katalize eden mitokondriyal transhidrojenaz enzimleri, bu reaksiyon için gerekli olan NADPH' yi, yüksek enerji seviyesinde bol miktarda bulunan mitokondriyal NADH' den sağlar. Sitoplazmada gerekli NADPH+H esas olarak pentoz fosfat yolu ve malik enzim ($NADP^+$ bağımlı malat dehidrojenaz) tarafından sağlanır [12-14]. IDH1 ve 2 enzimlerinin ters indirgeyici karboksilasyon reaksiyonu astrositler ve miyeloid

hücreler gibi normalde yüksek miktarda sitrat üreten bazı normal hücre tiplerinde daha aktiftir. IDH1 ve 2 tarafından katalize edilen reaksiyonların kontrolü hücre içindeki ICT ve α-KG seviyelerine bağlıdır [13]. Anabolik sürecin maksimum kullanıldığı lipit sentezi gibi reaksiyonlarda ve mitokondriyal solunum komplekslerinin hasarlanması veya tümör hücresine vasküler yetersizlik sebebiyle oksijen eksikliği görülmesi durumlarında yüksek intramitokondriyal NADH / NAD^+ oranı TCA döngüsünün yavaşlamasına sebep olur [15-17]. Bunun sonucunda mitokondri içerisinde biriken sitrat molekülleri sitoplazmaya taşınarak hızla bölünen tümör hücresi için biyolojik membranların yapısında bulunan yağ asitleri, fosfogliserit ve kolesterol sentezi için gerekli kaynak molekül görevi görür [2]. Tümör hücreleri aynı zamanda α-KG üretmek için aşırı glutamin ve glutamat alımını artırarak dolaylı yoldan sitrat sentezini en üst düzeye çıkarır [18-20].

2.1.2 İzositrat dehidrogenaz enzimi ve kanser

2008 yılında yapılan bir çalışma ile bazı santral sinir sitemi tümörlerinde IDH1 ve / veya 2' de neomorfik aktivite gösteren monoallelik mutasyonların, yüksek tanısal ve prognostik değere sahip tekrarlayan genetik değişiklikler olduğu gösterilmiştir [4]. Sonrasında yapılan geniş ölçekli çalışmalar neticesinde bu bilgiler doğrulanmış ve Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasında grade II-III gliomaların % 80'inde IDH mutasyonu varlığı bildirilmiştir [21-25]. Santral sinir sistemi malinitelerinden başka akut myeloid lösemi hastalarının % 16'sında, intrahepatik kolanjiokarsinoma vakalarının % 23'ünde, kondrosarkoma vakalarının % 56'sında IDH mutasyonuna rastlanmıştır [26-28]. Malinitelerde görülen IDH-1 mutasyonlarının % 91.86'sı 132. kodonda bulunan arjinin aminoasitinde değişikliğin gözlendiği R132H (histidin) olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.3). IDH-2 enziminde görülen en sık mutasyon ise 172. Kodonda bulunan arjinin aminoasidinin lizin ile değiştiği mutasyonlardır [29, 30].



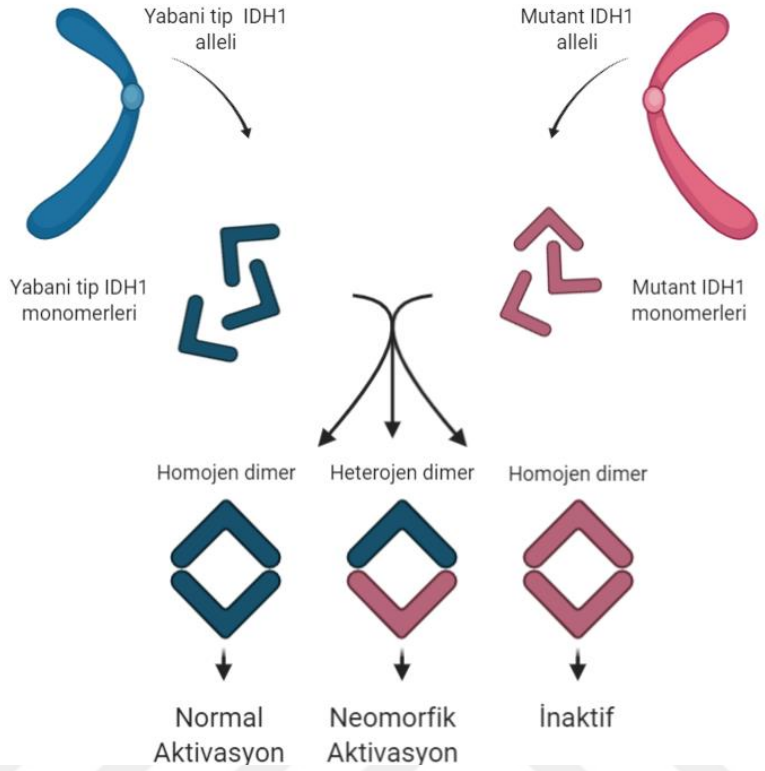
Şekil 2.3: $NADP^+$-bağımlı IDH normal ve R132H mutant sekansı.

2.1.2.1 IDH mutasyonunda kanserin moleküler mekanizması

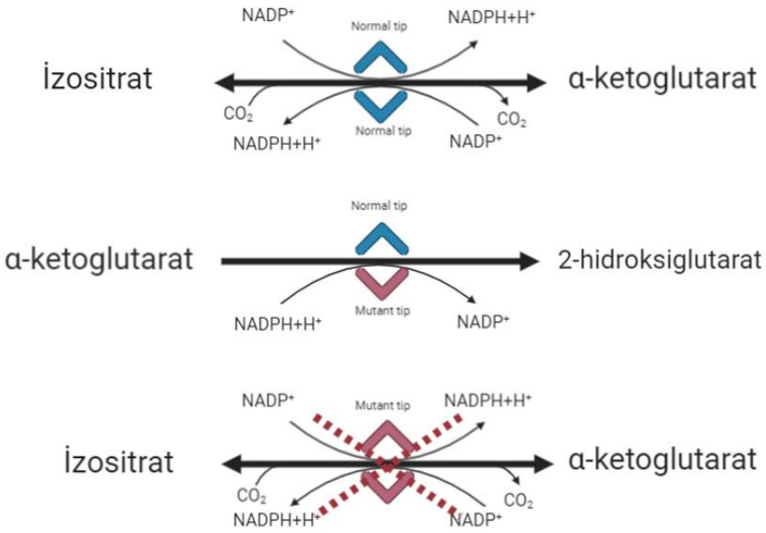
Hem IDH1 hem de 2 enzimleri homodimer olarak aktiftir. Enzimlerin her iki monomeri de aktif bölgeye katılım sağlar. Tümörde tekrarlayan arginin mutasyonunun sadece heterozigot durumda bulunduğu bilinmektedir [31, 32]. IDH mutasyonu için heterozigot bir hücrede normal tip-normal tip (NT-NT) dimerine ek olarak normal tip-mutant (NT-Mut) ve mutant-mutant (Mut-Mut) dimerleri bulunur[33]. Dimer yapıda enzimin ICT molekülünü doğru bir şekilde bağlayabilmesi için her iki monomerdeki arjinin aminoasidine ihtiyaç bulunduğu düşünülmektedir [9]. Bir mutant IDH aleli barındıran bir hücrede oluşan üç dimer tipinin ifadesi Şekil 2.4' de gösterilmiştir.

Her iki monomerde de iki arginin aminoasit değişikliği hem ileri oksidatif dekarboksilasyonunu hem de ters indirgeyici karboksilasyon reaksiyonlarını tamamen inhibe eder. Bir arginin varlığı ileri oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonunu tamamen inhibe ederken ters indirgeyici karboksilasyon reaksiyonunun ürünü olan ICT yerine (D) -2HG olarak değiştirir. Dimerik yapılardan birinde gerçekleşen mutasyonun mutasyon olmayan subunit üzerinde dominant inhibitör etki yaparak normal substrat bağlanmasını engellediği düşünülmektedir. Sonuç olarak, Mut-Mut dimerinin tamamen inaktif olduğu (yani ICT ile α-KG'yi birbirine dönüştürmediği ve (D) -2HG üretimini artırmadığı), Wt-Mut dimerinin ICT – α-KG dönüşümünü

gerçekleştirmediği, ancak ters reaksiyonla α-KG'den (D)-2HG üretimini artırdığı görülmektedir **(Şekil 2.5).**



Şekil 2.4: IDH1/2 enzimleri mutasyonu sonucu meydana gelebilecek dimer yapılar [9].



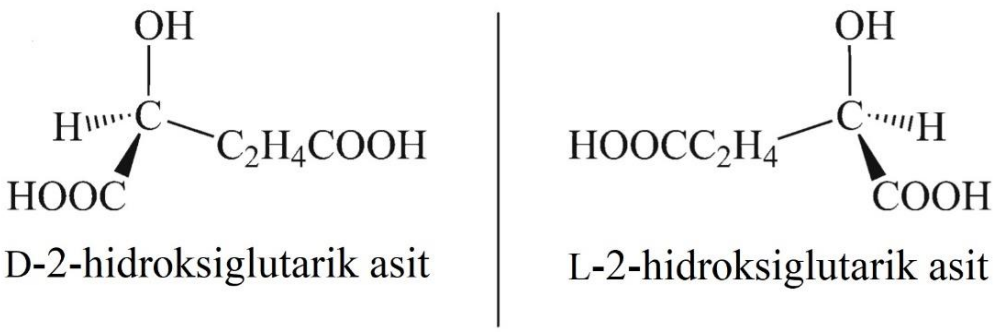
Şekil 2.5: Normal ve mutant tip IDH enzimlerinin dimerik yapısı ve aktivitesi[9].

1971 de Kanser araştırmacısı Knudson tümör baskılayıcı bir genin fenotipik bir değişikliğe neden olmak için her iki allelinde de mutasyonlarla veya epigenetik

susturma yoluyla etkisiz hale getirilmesi gerektirdiğini savunan çift-vuruşlu hipotezi öne sürer [34]. IDH1 ve 2'de neomorfik aktiviteye sebep olan R132 ve R172 mutasyonlarının Knudson'un hipotezinin aksine heterozigot mutasyonlar olduğu saptanmıştır[35].

2.1.2.2 (D)-2-hidroksiglutarat molekülünün özellikleri

İzositrat dehidrogenaz(IDH) enzimlerinde meydana gelen mutasyonlar çoğunlukla yanlış anlamlı mutasyonlar olup enzimlerin aktif bölgelerinde bulunan ve katalitik fonksiyonlarını düzenleyen amino asitlerde değişikliklere neden olur. Mutasyona uğramış IDH'ler normalde ürün olarak ortaya çıkan α-KG'ı substrat olarak kulanarak (D)-2-hidroksiglutarata [32, 36]. Bu metabolit, beş karbonlu bir dikarboksilik asittir. İkinci karbonu kiral yapıda olan bu molekül (D)-2-HG ve (L)-2-HG olarak iki enantiyomere sahiptir (Şekil 2.6). Metabolizmada her iki enantiyomerin de bilinen bir fizyolojik rolü yoktur [37]. Her iki molekülün sırasıyla (D)-2-HG dehidrogenaz (D2HGD) ve (L)-2H-G dehidrogenaz (L2HGD) enzimleri tarafından α-KG oluşturmak üzere detoksifiye edilen, mitokondriden kaynaklanan küçük bir miktarda normal "atık" metabolit olduğuna inanılmaktadır[38].



Şekil 2.6: 2-hidroksiglutarat molekülünün D- ve L- enantiyomerleri[38].

(D) enantiyomeri yalnızca neomorfik IDH bulunan tümör hücreleri tarafından üretilen 2-hidroksiglutarat formudur ve bu tümör hücrelerinde yüksek üretim gösterdiği tespit edilmiştir [6, 7]. Bu yüksek üretimin D2HGD enziminin detoksifikasyon kapasitesini aşarak, enzim normal şekilde çalışmaya başlasa bile, hücre içi birikmesine yol açtığı düşünülmektedir [39]. Buna rağmen otozomal resesif geçişli metabolik hastalık olan tip 1 ve tip 2 d-hidroksiglutarik asidüri hastalarında malinite oranında artış gözlenmemiştir [40]. Bunun sebebinin bu hastalarda kanserli hastalara oranla düşük

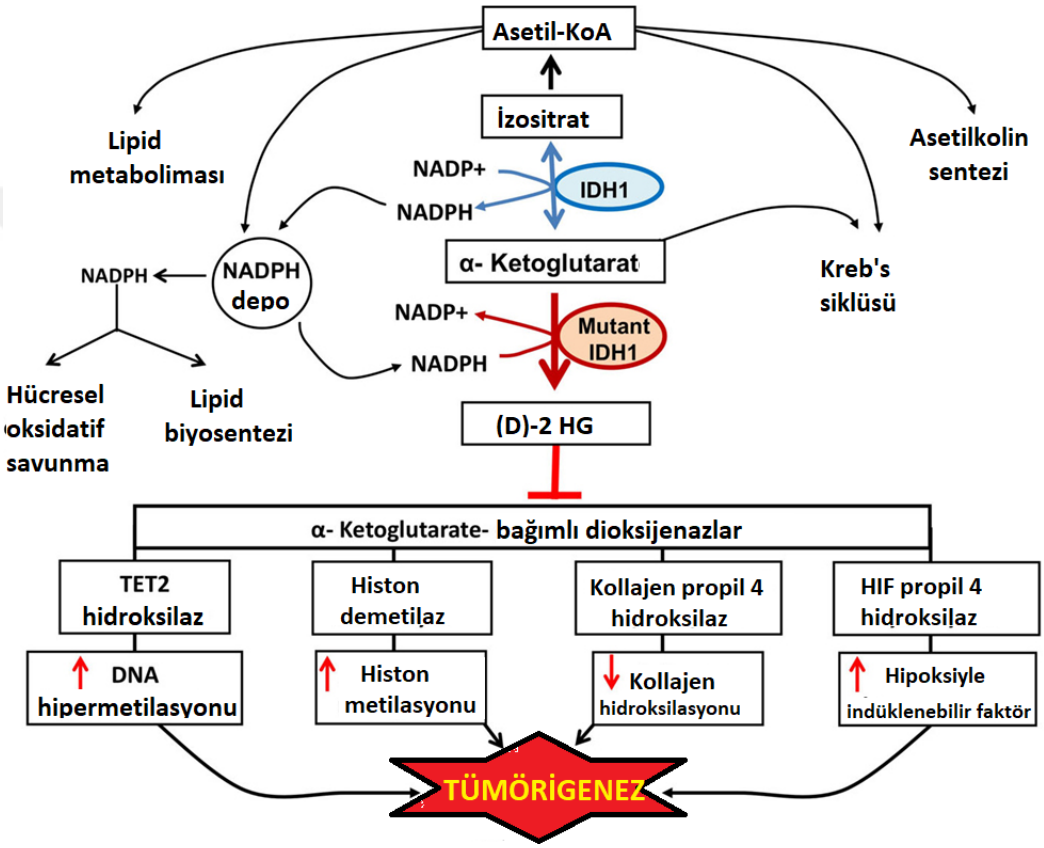
miktarda (D)-2HG üretimi ve düşük sağkalım oranları nedeniyle takip edilememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir[41, 42].

(D)-2-HG molekülünün kimyasal yapısı, α-KG (α-ketoglutarik asit) ile benzerlik gösterir. Memeli hücrelerinde ko-substrat olarak α-KG kullanan 60'tan fazla dioksijenaz enzimi bulunur. Bu enzimler (D)-2-HG inhibisyonunun hedefi olarak kabul edilir [43]. D-2-HG'nin histon demetilazlar üzerinde α -KG bağlanma bölgelerini işgal ederek yarışmalı inhibisyon etkisi yaptığı gösterilmiştir [44]. (D)-2-HG'nin, KDM7A (demetilat H3K9me2 ve H3K27me2) KDM4A / B (demetilat H3K9) ve H3K36 demetilazlar dahil olmak üzere birçok histon demetilazını inhibe ettiği belirtilmiştir [45, 46]. TET enzimleri ise, ten-eleven translokasyon (TET) metilsitozin dioksijenaz ailesidir. TET, 5-metilsitozinin (5-mC) 5-hidroksimetilsitozine (5-hmC), 5-hmC'den 5-formilsitozine (5-fC) ve 5-fC'nin 5-karboksilsitozine (5-caC) dönüşümünü içeren demetilasyon reaksiyonlarını katalize eder [47]. (D)-2-HG yarışmalı olarak TET1 ve TET2 enzimlerini inhibe ederek sitozin demetilasyonunu sınırlar. Bu da genom boyunca 5-mC birikmesine neden olur [48, 49]. Yine (D)-2-HG birikiminin α-KG'ye bağlı enzimlerden olan DNA onarım proteinlerinlerinden olan alkB homolog proteinin (ALKBH) sentezinde görevli enzimlerinin inhibisyonuna sebep olarak da DNA alkilleyici ajanlara duyarlı hale getiren DNA onarım yolunu etkilediği gösterilmiştir [50]. Bundan başka mutant IDH1'in, histon metilasyonunu değiştirerek DNA hasar sensörü ataksi-telanjiektazi mutasyona uğramış (ATM) sinyal yolunu down-regüle ederek DNA'ya zarar veren ajanlara duyarlılığa yol açabileceği [51, 52], diffüz astrositomadaki ATRX eksikliğinin DNA onarım yollarını ve tedaviye duyarlılığı etkileyebileceği [35], poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP1) ile ilişkili DNA onarım yolağının, azalmış NAD^+ kullanılabilirliği nedeniyle mutant hücrelerde büyük ölçüde kullanılamadığını, bu sebeple PARP inhibitörlerini içeren kombinasyonların IDH mutant kanser hücrelerini kemoterapi ve radyoterapiye duyarlı hale getirebileceği gösterilmiştir [53-55].

Hücresel NADPH+H molekülü indirgeyici ekivalan molekül olarak kullanılması sebebiyle antioksidanlara karşı savunmada büyük role sahiptir[56]. IDH mutant malinitelerde enzim neomorfik aktivitesi sonucu kofaktör olarak NADPH' yi kullanır ve hücresel NADPH+H/NADP oranını değiştirerek reaktif oksijen moleküllerinin (ROS) artışına sebep olur. Bu durum redoks homestazisinde bozulmaya yol açar [55, 57, 58]. Artan redoks yükü farklı anti-oksidan yolakları harekete geçirir[59, 60]

Bununla birlikte neomorfik aktivite gösteren bir hücrede ileri oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonunu devam ettirecek normal tip IDH enzimi de bulunur. Bu sayede hücrenin, yaşam için indirgeyici biyosentez reaksiyonlarında ve reaktif oksijen radikallerine karşı savunmada gerekli NADPH'ı üretebileceği düşünülmektedir [9].

IDH mutasyonları sonucu malinite gelişimine yol açan yolaklar ve moleküller Şekil 2.7' de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: IDH mutasyonu sonucu kanser gelişiminin moleküler mekanizması[61].

2.1.2.3 IDH mutasyonunun uzun dönem etkileri

IDH mutasyonu gösteren glioblastome multiforme (GBM) hastalarında ortalama sağ kalım 65 ay iken, yabanıl tip-IDH olanlar için 20 ay olarak gösterilmiştir. IDH mutasyonlu GBM hastaları arasında mutant olmayanlara kıyasla hastalıksız sağkalımda da artış görülmüştür [62]. IDH mutasyonunun varlığı kanser hastasına tedavi yaklaşımını değiştirmesi sebebiyle tümör sınıflamasına dahil edilmiştir.

IDH'deki mutasyonların yüksek epilepsi prevalansı ile ilişkili olduğu birbirinden bağımsız çalışmalar ile gösterilmiştir [63-66]. (D)-2-HG molekülü yapısal olarak

santral sinir sisteminde baskın uyarıcı nörotransmiter olan glutamata benzer. Tümör mikroçevresinde artan (D)-2-HG'ın N-Metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerini aktive ederek nöronların uyarılmasına ve dolayısıyla epileptik değişikliklere yol açan bir glutamat analoğu olarak hareket etmesine sebep olabileceği; mutant IDH'yi hedefleyen tedavilerin D-2-HG üretimini inhibe ederek epileptik nöbet sıklığını azaltacağı düşünülmüştür [67].

2.1.2.4 IDH mutasyonu tespit yöntemleri

IDH mutasyonu tespiti amacıyla en çok kullanılan yöntemler immünohistokimyasal boyama ve genetik dizi analizidir. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi cerrahi sırasında tümörün makroskobik analizi ile nekrotik doku içermediği düşünülen kısımlarından alınan örnekler üzerinde çalışılır. Parafine gömülü tümör örneklerinin en sık görülen R132H mutant IDH enzimine karşı üretilen monoklonal antikorlar ile yapılan muamelesi mutant enzim içeren hücrelerin sitoplazmalarının sarı-kahverenkli boyanması ile sonuçlanır [10]. Şekil 2.8 'de anti mutant IDH ile boyama örneği gösterilmiştir.

a: Mutant IDH pozitifliği gösteren astrositoma dokusunda Hematoksilen-eozin boyaması

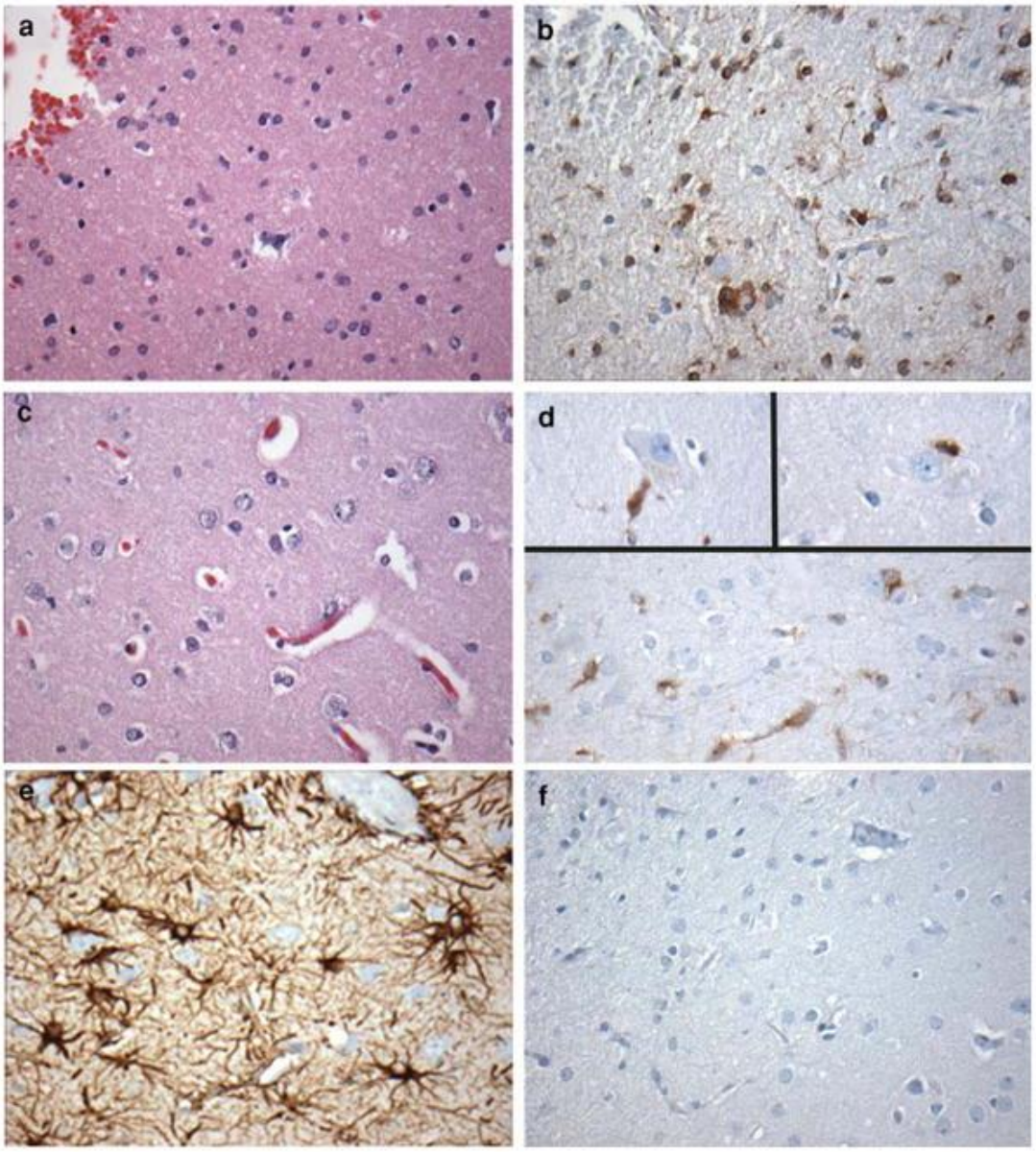
b: Aynı dokuda güçlü sitoplazmik granüler boyama gösteren mutant IDH boyaması. c: İnfiltre tümör hücreleri içeren dokuda Hematoksilen-eozin boyaması,

c: Aynı dokuda mut-IDH boyaması.

d: (Üst ve alt panel) IDH-1 mutant pozitifliği içeren 2 vaka örneği.

e: Nöropatolojide kullanılan farklı bir histokimyasal boya olan glial fibriler asidik protein (GFAP) ile pozitif boyanan doku örneği.

f: Mutant-IDH ile negatif boyama örneği [68].



Şekil 2.8: DSÖ grade II astrositoma ve astrositosiz dokularının immünohistokimyasal boyama örneği.

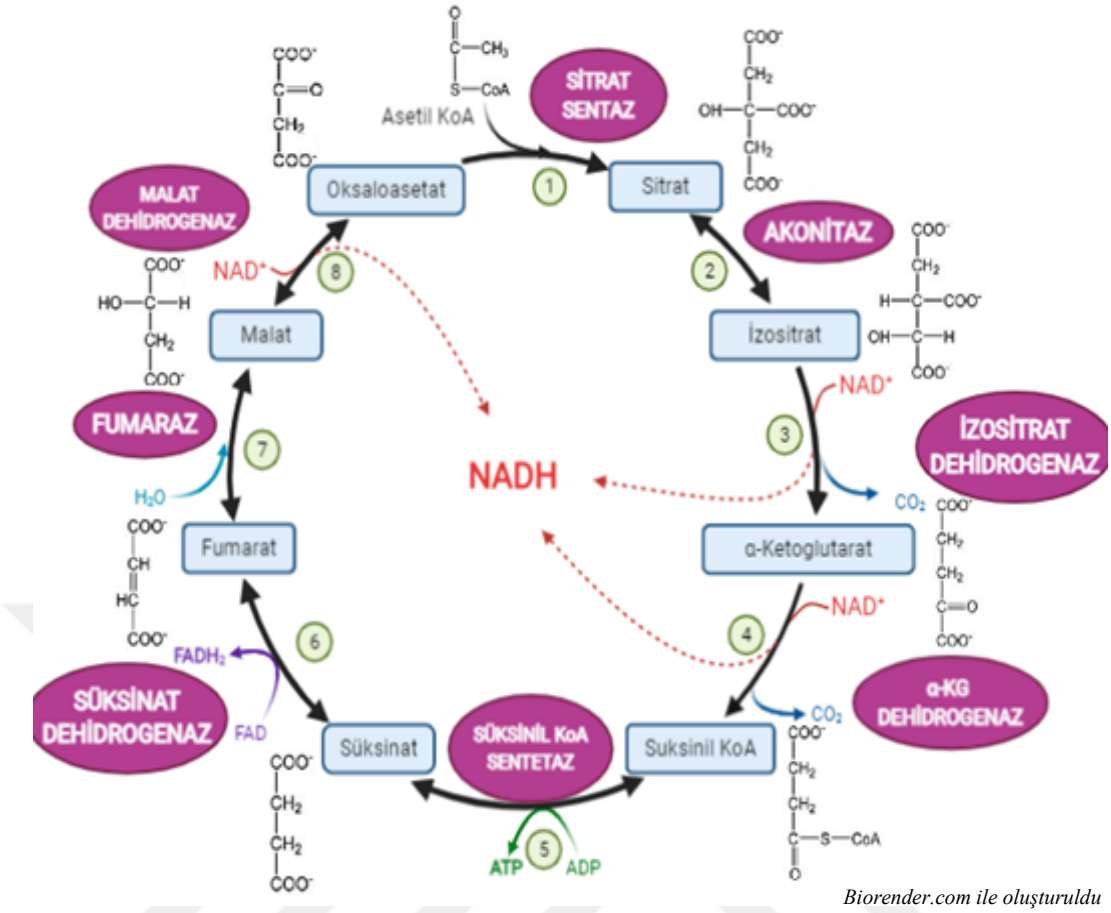
Bir diğer sık kullanılan yöntem olan genetik dizi analizi ise yine formalinle sabitlenmiş parafine gömülmüş tümörlü doku örnekleri üzerinden genomik DNA 'nın izolasyonu ile yapılır [10]. Bu işlem için ek ekipman, malzeme ve tecrübeli personel gerekmekte olup, rutinde kullanılmaya elverişli bir teknik değildir. Araştırma amaçlı çalışmalarda kullanılan bir yöntemdir.

Araştırmalarda kullanılan bir diğer metot ise mutant enzimin ürünü olarak ortaya çıkan (D)-2-HG molekülünün manyetik rezonans spektroskopisi ile tesptine dayanır. İnvaziv girişim gerektirmeyen bu teknikte sonuçlar beyin tümörü bulunan hastalardan yapılan görüntülemelerde (D)-2-HG molekülünün oluşturduğu spektra üzerinden

değerlendirilir. Fakat MR spektroskopisinde (D)-2-HG molekülü normalde beyinde bulunan veya kanserde birikebilen diğer metabolitlerle örtüşen spektra verir [69]. (D)-2-HG molekülünün sinyal oluşturabilmesi için yüksek konsatrasyonda, dolayısıyla tümörün ileri evrelerinde kullanılabilmesi; ayırıcı spektra oluşturamaması; manyetik rezonans görüntüleme cihazının kolay erişilebilir bir cihaz olmaması bu tekniğin kullanımını zorlaştıran yönleridir [70].

2.1.3 İzositrat dehidrogenaz 3 enzimi

IDH1 ve 2'den farklı olarak IDH3 (E.C. 1.1.1.41) enzimi NAD^+ bağımlıdır ve izositratın geri dönüşümsüz bir şekilde α-KG'ye dönüşümünü katalize eder. Mitokondri içerisinde gerçekleşen ve TCA (trikarboksilik asit) döngüsü içerisinde yer alan bu reaksiyon NAD^+'' ın NADH' ye indirgenmesinin gerçekleştiği, enerji metabolizması açısından önemli role sahip bir basamaktır (Şekil 2.9). TCA döngüsünün IDH3 tarafından katalize edilen basamağında üretilen NADH metabolizmada biyolojik pil olarak görev yapar ve ATP üretmek için elektron taşıma zinciri (ETC) tarafından kullanılır[1, 71, 72] . Bu enzimin aktivitesi substrat varlığı, allosterik aktivatör ve inhibitörler ile düzenlenir. Kalsiyum, ADP ve sitrat ile aktive olurken ATP, NADH ve NADPH ile inhibe olur. 15q25.1 – q25.2'de IDH3A tarafından kodlanan iki α-alt birimi, 20p13'te IDH3B tarafından kodlanan bir β-alt birimi ve Xq28'de IDH3G tarafından kodlanan bir γ-alt birimi olan bu enzim heterotetramer yapıya sahiptir. α alt birimlerinin katalitik, β ve γ alt birimlerinin ise düzenleyici olduğu düşünülmektedir [9, 73].



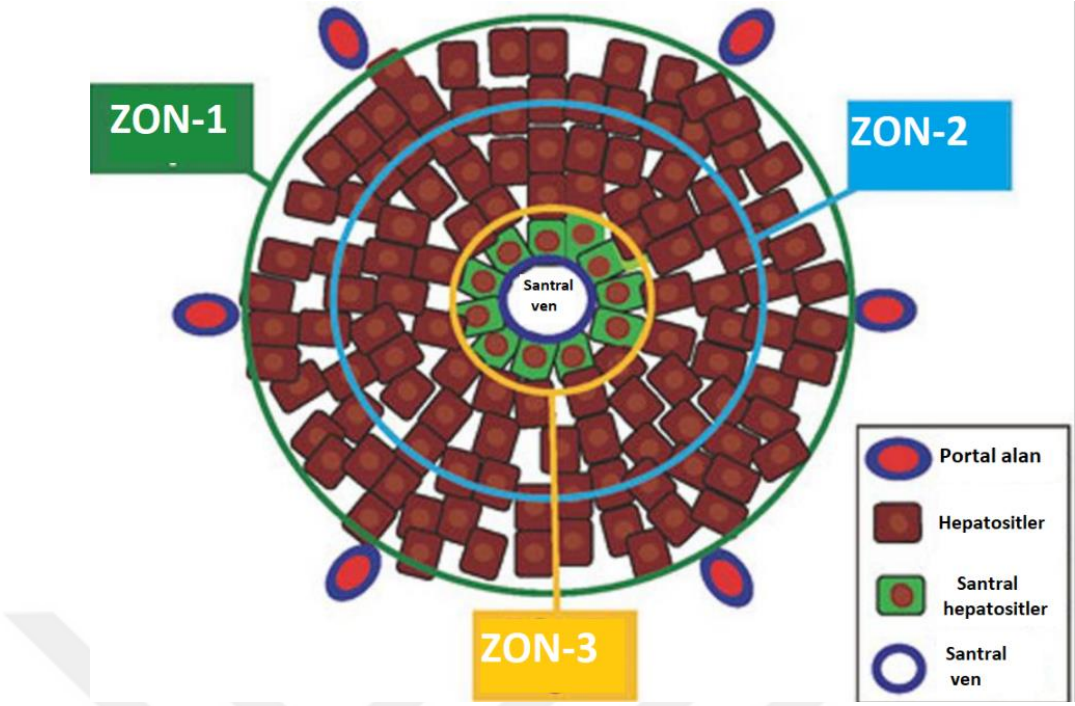
Şekil 2.9: Trikarboksilik asit siklüsü.

Farklı tümör dokularından elde edilen örneklerde yapılan genetik analizlerde IDH3 enzimini kodlayan genlerde IDH1 ve IDH2 deki kadar sık tekrarlayan mutasyonlara rastlanmamıştır. IDH1 ve IDH2 de meydana gelen aktive edici mutasyonlar monoallellik iken IDH3 enziminde gerçekleşen mutasyonun aktivitede değişiklik yapabilecek özellikte olması için mutasyonun biallelik olması gerektiği düşünülmektedir. Gerçekleşecek monoallelik bir mutasyonun normal allel tarafından telafi edilerek enzimde düşük de olsa aktivite gösterebileceği düşünülmektedir.IDH3 mutasyonlarının kanserojen rolü hakkında net bir bilgi edinilememiştir [74].

TCA döngüsünün kontrol enzimlerinden IDH3 meydana gelecek bir inhibisyon tüm TCA döngüsünü ve dolayısıyla da mitokondriyel ATP üretiminin durmasına neden olacaktır [75]. IDH3 enzimini kodlayan gende gerçekleşecek biallelik bir mutasyonun, tek yönlü çalışan bir enzim olması sebebiyle, enzim üzerinde neomorfik aktivite değişikliği yaparak hücrede karsinojenez geliştirmesinden ziyade IDH3 enzimini inhibe ederek hücreyi apoptoza sürükleyeceği düşünülmektedir[9].

2.1.4 Normal tip $NADP^+$-bağımlı IDH enzimi ve klinikte kullanımı

IDH enzimi vücutta birçok dokuda yoğun olarak bulunan bir enzimdir. Sağlıklı insan serumunda referans aralığı 0 – 12 IU/L olarak verilmektedir [3]. Serumda bu seviyenin üstünde tespit edilmesi karaciğer parankim harabiyeti sonucu karaciğer hücrelerinin membran bütünlüğünün bozulması ve enzimin dolaşıma katıldığı şeklinde yorumlanmaktadır [76]. Klinikte karaciğer parankim harabiyetini saptamak ve akut veya kronik hepatitli hastalarda hasarın derecesini izlemek için yararlanılan enzimler aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), γ-glutamil transferaz (GGT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) dır. Bu biyobelirteçlerden karaciğer hücreleri için spesifitesi en yüksek olan ALT enzimidir. Dolayısıyla serumda ALT enziminin aktivitesinde artış gözlendiği durumlar karaciğer parankim hasarını akla getirmektedir. [3, 77]. Karaciğer dokusu histolojik olarak zon 1(periportal), zon 2 ve zon 3 (sentrilobüler) olmak üzere 3 bölge ile tarif edilir (Şekil 2.10). Klinikte 'Karaciğer fonksiyon testleri' olarak kullanılan enzimlerin dağılımı hücrenin bulunduğu bu hepatik asinüs alanlarına göre farklılık gösterir. ALT'nin zon 1'de (Z1) daha yoğun bir dağılıma sahip olduğu bilinmektedir [78, 79]. Bu nedenle, baskın olarak zon 3 (Z3)' te meydana gelen hepatik nekrozu olan hastalarda serum ALT seviyesinin belirginleşmeye başlaması hastalığın geç dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. Hâlihazırda kullanılan karaciğer fonksiyon testleri arasından Z1 ve Z3'e spesifik yükselen olmadığı için karaciğer nekrozunu ayırt edilmesi karaciğer biyopsisi ile mümkündür [80]. Karaciğer hastalıklarında serum seviyesinde değişiklik gözlenen NADP bağımlı sitoplazmik IDH enziminin serumda aktivitesinde artma hastalığın erken döneminde gözlenir ve karaciğer parankim hasarının oldukça hassas bir göstergesi olarak kabul edilir [78]. Özellikle karaciğer zon 3 sentrilobuler nekrozunun erken döneminde serumda IDH enzim aktivitesinde artış görüldüğü literatürde yer alan bilgiler arasındadır [81]. Bu enzimin serumdaki aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin tespit edilebilmesi hem karaciğer hasarının daha erken ve güvenilir tespit edilebilmesine hem de karaciğer hastalığı bulunan bireylerde Z1 ve Z3 hepatik nekrozun ayrımında kullanılabileceği düşünülmektedir [78].



Şekil 2.10: Karaciğer lobül görüntüsü üzerinde zonların gösterimi[82].

Serum IDH enzim aktivitesinde en fazla artış (1-40 kat) viral hepatitlerde gözlenir. Hafif bir yükselmeden sonra görülen ani düşüşler de kötü prognozlu masif nekrozun habercisidir. Enfeksiyoz mononükleoz hastalığında da viral hepatitlerde olduğu gibi fazla artışlar görülür fakat toksik hepatitli hastlarada normalin en fazla 3-8 katına çıkar[3]. Hâlihazırda klinik olarak kullanılan Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT) ve Gama glutamil transferaz (GGT) gibi enzimlerin karaciğere spesifitesi düşük olup, biliyer sistem hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların karaciğer parankim hasarından ayırt edilmesinde yetersiz kalabilmektedir. Bu sebeple IDH enzim aktivitesi ölçümü karaciğer hasarının laboratuvar testleriyle belirlenmesinde daha güvenilir bir parametre olarak katkı sağlayacaktır.

2.2 Spektrofotometrik ölçüm

Bir çözelti içerisindeki madde miktarını çözeltiniden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine fotometri, bu ölçümü yapan cihazlara ise fotometre adı verilmektedir. Işığın tüm dalga boylarında (görünür, ultra viole (UV), infrared (IR)) ölçüm yapılabilir. Bir çözeltiye gönderilen ışıkğın çözelti tarafından tutulmasına absorbsiyon (emilim), ışığın çözeltiden geçişine transmisyon adı verilmektedir. Çözeltiye gelen ışık ile çözeltiden çıkan ışık arasında Lamber-Beer kanunu adı verilen matematiksel bir ilişki bulunmaktadır (2.1).

$$I = I_0 \times 10^{-abc} \quad (2.1)$$

I : Çözeltiden çıkan ışığın şiddeti

I_0 : Çözeltiye gelen ışığın şiddeti

a : Işığın dalga boyuna ve maddeye bağlı sabit molar absorbsiyon katsayısı

b : Çözeltiden geçen ışık yolunun uzunluğu (cm)

c : Çözeltideki maddenin konsantrasyonu (mol/L)

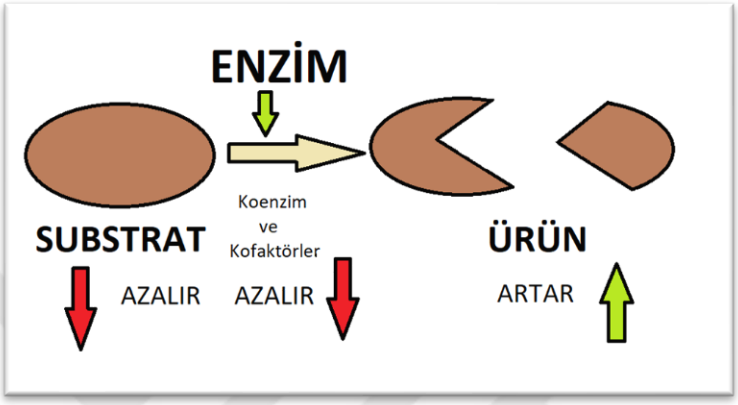
Bu kanuna göre çözeltiden çıkan ışığın şiddeti ışığın molar emilim katsayısı, çözeltinin aldığı yol ve madde konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Fotometrik ölçüm sırasında hassasiyeti artırmak için ölçümü yapılan maddenin ışığı maksimum absorbe ettiği dalga boyu kullanılır. Bu amaçla maddenin hazırlanan 1 M konsantrasyondaki çözeltisi ile farklı dalga boylarında ölçüm yapılır. En yüksek değerin alındığı dalga boyu o maddenin ölçümünde referans dalga boyu olarak kullanılır. Fotometrik ölçüm başlıca 2 grupta toplanır:

1. End-point okuma: Ölçümün reaksiyon tamamlandıktan sonra yapılmasına end point okuma denir. Reaksiyon karışımı belli bir süre ve belli bir sıcaklıkta inkübe edilir. Reaksiyon sonucu ürün oluşumu ve dolayısıyla renk değişimi gözlendikten sonra okuma yapılır.
2. Kinetik okuma: Birim zamandaki absorbans değişimi ölçülerek değerlendirilen bu yöntemde genellikle enzimlerin katalitik aktivitelerinin tayini amacıyla kullanılır. Hesaplama için deney ortamında kromojen maddenin molar absorbsiyon katsayısının bilinmesi gerekir. Analiz tüpüne reaktif ve numune konup belirli bir sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulduktan sonra ilk absorbans değeri okunur. Daha sonra belirli aralıklarla tekrar absorbans ölçümleri yapılarak müteakip 2 okumanın farkı alınarak ‘ΔA’ değerleri bulunur. Bu ΔA değerleri toplanıp okuma sayısına bölünerek ortalama zamana bağlı absorbans değişimi ΔA/t değeri elde edilir [83].

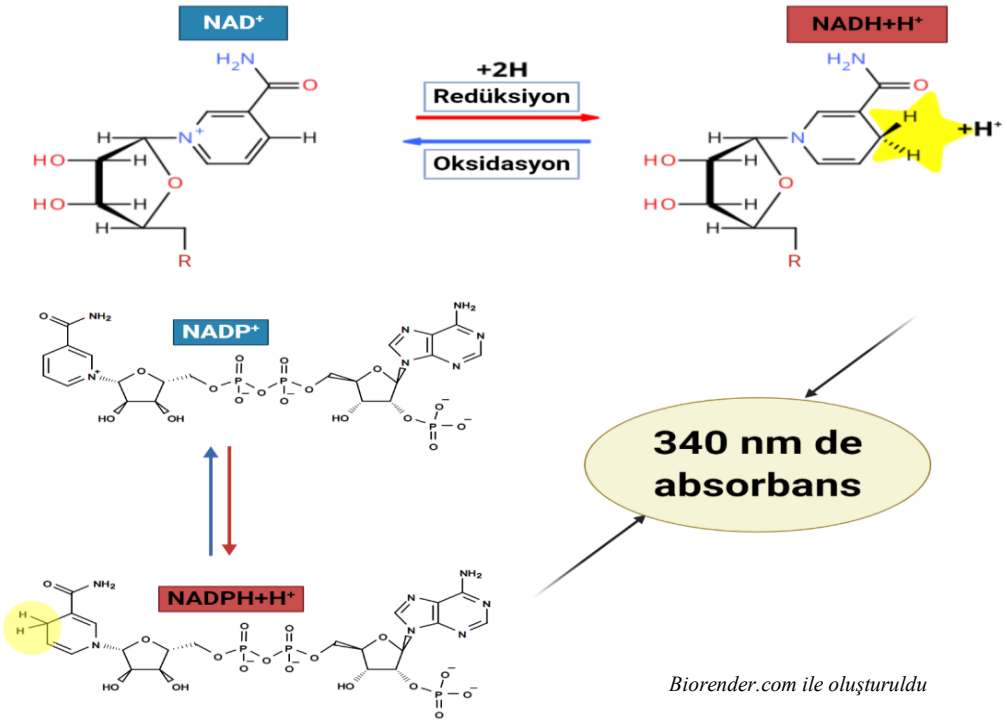
2.2.1 Enzim Aktivitesi Ölçümü

Enzim aktivitesinin ölçümü substratın fizikokimyasal özelliklerini ürününkilere göre ölçülebilir bir şekilde ayırt edebilmesi etrafında tasarlanır [84]. Bir enzimin aktivitesi ölçülmek istendiği takdirde reaksiyona giren substrat konsantrasyonunun azalması, reaksiyon sonucu oluşan ürün konsantasyonun artışı veya reaksiyon sırasında tüketilen koenzim veya kofaktör konsantrasyonunun azalmasından yararlanılır (Şekil 2.11).



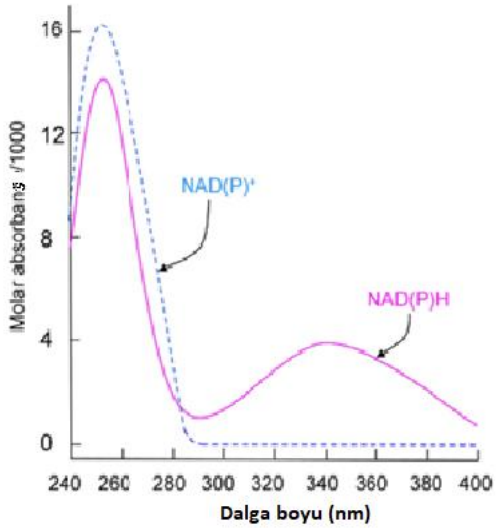
Şekil 2.11: Reaksiyon sırasında artan ve azalan bileşenler

Klinik biyokimya laboratuvarlarında serumda enzim aktivitesini ölçmeye yönelik en sık kullanılan moleküller $NADP^+$ ve NAD^+ molekülleridir (Şekil 2.12)(Tablo 2.1).



Şekil 2.12 : $NADP^+$, NADPH ve NAD^+, NADH moleküllerinin kimyasal gösterimi.

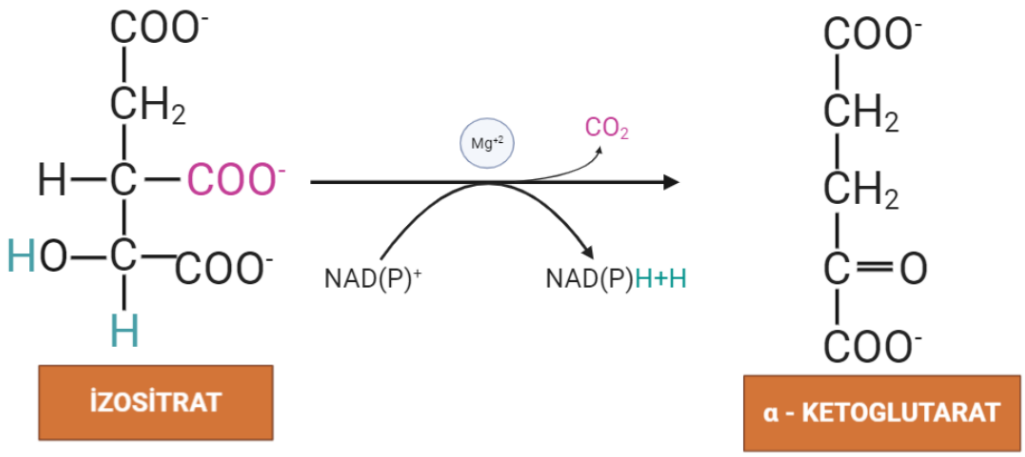
Bu moleküller birçok enzimin kofaktörü olarak görev yaparak reaksiyon sırasında indirgenir veya yükseltgenirler. İndirgenmiş moleküller olan NADPH ve NADH 340 nm'de maksimum absorbans gösterir (Şekil 2.13). Bu özelliğinden yola çıkılarak otomatik kimya analizörlerinde sinyal artışı hesaplanır ve numuneler içerisindeki ölçülmek istenen maddenin konsantrasyonu hakkında yorum yapılabilir.



Şekil 2.13: $NAD(P)^+$ ve NAD(P)H moleküllerinin absorbans spektrumu [85].

Tablo 2.1: Klinikte yaygın kullanımı olan enzimler [85].

Enzim	Klinik kullanımı
Asit fosfataz	Prostat karsinomu
Alkalin fosfataz	Kemik ve karaciğer hastalıkları
Amilaz	Pankreatit
Aspartat aminotransferaz	Karaciğer ve kalp hastalıkları
Alanin aminotransferaz	Karaciğer hastalıkları
Kreatin fosfokinaz	Muskuler distrofi
γ-glutamil transpeptidaz	Karaciğer hastalıkları, alkolizm
α-hidroksibütirat dehidrogenaz	Kalp hastalıkları
Laktat dehidrogenaz	Karaciğer ve kalp hastalıkları
Lösin aminopeptidaz	Pankreas karsinomu, araciğer hastalıkları



Biorender.com ile oluşturuldu

Şekil 2.14: İzositrat dehidrogenaz enzimi reaksiyonu.

Bu çalışma ile aktivitesini ölçmek istediğimiz izositrat dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon Şekil 2.14'de gösterilmiştir. Bu reaksiyon sonucu oluşan NADH/NADPH molekülü üzerinden Lambert-Beer denkleminin matematiksel düzenlenmiş versiyonu (Denklem 2.2) kullanılarak enzim aktivitesi tayini yapılacaktır.

$$\frac{\Delta A/_{dk} \times Total\ Volüm\ (ml) \times 10^6}{\varepsilon \times Işık\ yolu \times Numune\ Volümü\ (ml)} \qquad (2.2)$$

2.2.2 Metodun geçerli kılınması

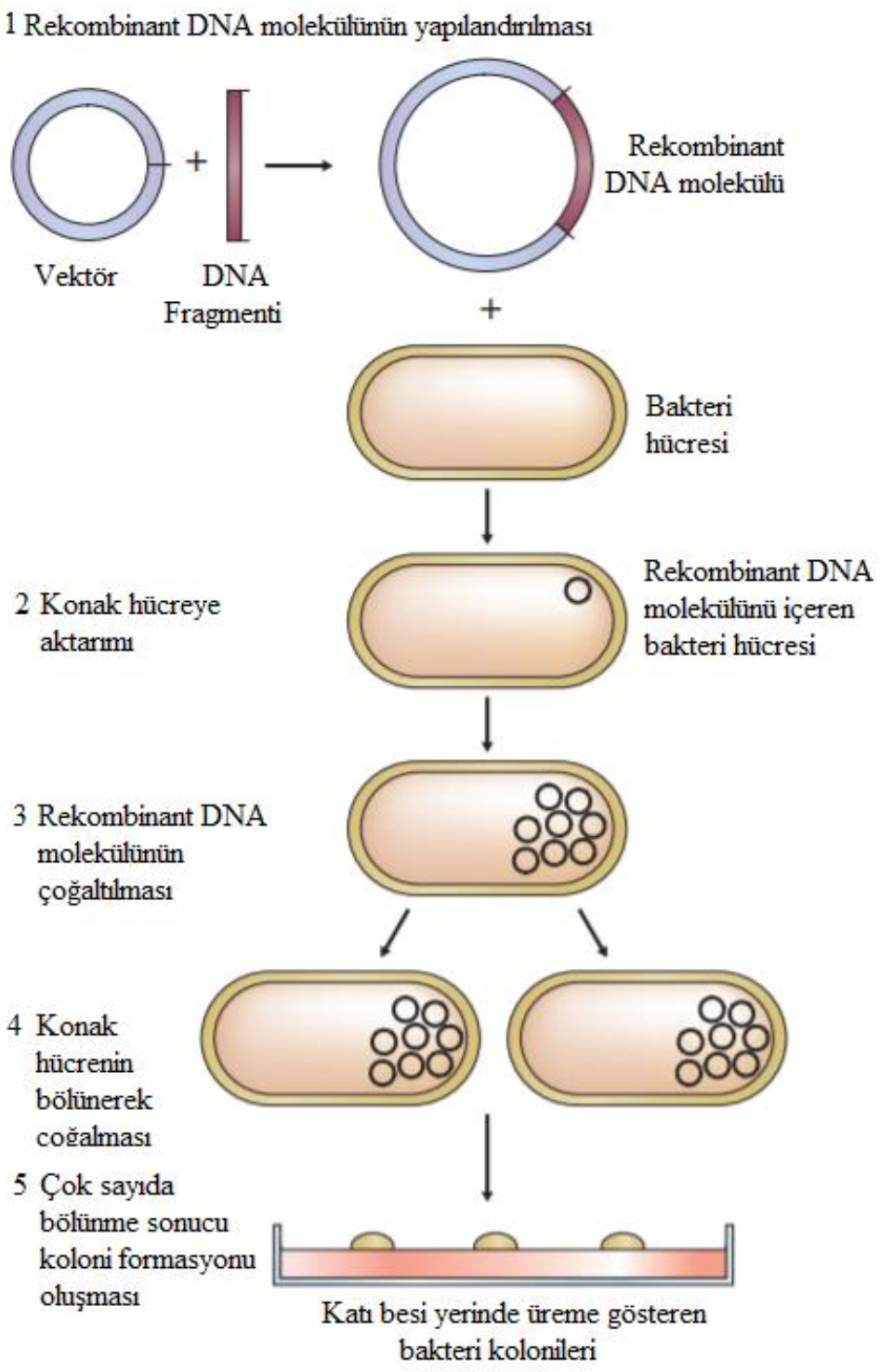
Klinik kimyada geliştirilen bir metodun rutin kullanıma uygun hale getirilmesi için sağlanması gereken bir takım performans kriterleri bulunur. Bunlar kesinlik ve doğruluk, analitik sensitivite, linearite, kalibrasyon, geri-kazanım, ölçüm belirsizliği ve metot karşılaştırma olarak sıralanabilir [86]. Bu performans kriterlerini karşıyabilmek adına kalite-kontrol malzemesi olarak kullanılan 'Sertifikalı Referans Matertal (CRM)' kullanılır. Doku ve biyolojik CRM leri ise hazırlaması en karmaşık ve pahalı malzemelerdir [87]. Bu amaçla geliştirilen enzimatik bir metodun kalite – kontrol malzemesi olarak kullanımına uygun rekombinant enzim üretimi büyük kolaylık sağlayacaktır. Geliştirilen rekombinant enzimin aktivite ölçümü, saflaştırılması ve standardize edilerek kullanıma sunulması metodun geçerli kılınması açısından önemlidir. Çalışma amacı olan $NADP^+$-bağımlı IDH ve $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH enzimi aktivite ölçüm metodunun geliştirilme basamaklarında kullanılmak üzere rekombinant olarak $NADP^+$- bağımlı normal IDH1 ve R132H mutant IDH1 enzimi üretimi yapılması planlanmıştır.

2.3 Rekombinant Enzim Üretimi

Yaşamın yapı taşları olan proteinler, doğal metabolizmalarının bir parçası olarak tüm canlı türleri tarafından sentezlenir. Rekombinant protein üretimi ilaç ve kimya sanayi, tarım ve gıda sektörü, biyoyakıt üretimi, enzim endüstrisi, kağıt ve deri üretimi, tanı kitleri ve tekstil sanayi gibi geniş kullanım alanlarına sahiptir. Tıpta geniş kullanım alanına sahip olan mikrobiyel fermentasyon sanayisinin kullanıma başlaması 1900 lü yılların başına dayanır. Hâlihazırda 'Food and Drug Administration' (FDA) onaylı ilaç sanayisinde kullanılan rekombinant teknoloji ile üretilmiş insülin, büyüme hormonu, pıhtılaşma faktörü – 8, albümin gibi 200 den fazla peptit ve protein bulunmaktadır [88].

1970'lerde başlayan endüstriyel enzim üretimi daha çok bitki ve hayvan kaynaklarından geleneksel yöntemlerle gerçekleşmiştir. Bu teknikler ile maliyet – fayda açısından istenilen verim alınamamıştır. 1980 lerde mikroorganizmalardan enzim üretimi geliştirilmeye başlandığında çok daha basit, hızlı, ucuz ve genetik olarak yönlendirmeye açık olduğundan hızla birçok sektörde kullanılmaya başlanmıştır [88].

Rekombinant protein üretiminin başlıca klonlama basamakları Şekil 2.15'de gösterilmiştir.



Şekil 2.15: Klonlamanın ana basamakları[89].

İlk olarak ilgili hedef proteini kodlayan genetik bilginin edinilmesi gerekir. Bu bilgi 'full-lenght' bir DNA parçasından elde edilebileceği gibi ticari olarak da temin edilebilir. Genetik kod uygun kesim enzimleri ile kesilir ve istenen genetik materyal taşıyıcı vektöre aktarılarak ligasyon işlemi yapılır. Bu aşamada rekombinant DNA molekülü elde edilmiş olur. Rekombinant molekülün çoğaltılması için konak hücreye

aktarımı yapılır. Transformasyonun gerçekleştiği hücreler seçilerek çoğaltılır ve istenen proteinin üretilmesi için ekspresyon konak hücresine aktarılır. Ekspresyon konağında yine transformasyonun gerçekleştiği hücreler seçilerek büyük hacimlerde indüksiyonu gerçekleştirilir. İlgili proteinin üretildiği varsayılarak saflaştırma aşamasına geçilir [89].

2.3.1 Rekombinant üretimde en sık kullanılan mikroorganizmalar

Escherichia coli

Escherichia coli (E. Coli) protein üretimi için kullanılan en eski konakçılardan biridir [90]. Hızlı ekspresyon, yüksek verim, kültür şartlarının ve genetik modifikasyonunun kolaylığı, düşük maliyetli seri üretime olanak tanıması gibi avantajları bu mikroorganizmanın sık kullanım nedenlerindendir. Buna rağmen disülfit bağı olan proteinlerin ekspresyonunun zorluğu, glikolize olmayan protein üretimi, endotoksin üretmesi, hücre harabiyetine sebep olan asetat fomasyanu oluşturması, inklüzyon cisimciği şeklinde üretilen proteinlerin tekrar katlanmaya ihtiyaç duyması gibi dezavantajlarının olması rekombinant üretimde kullanımını kısıtlamaktadır [90].

Bacillus

Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus* deterjan sanayinde kullanılan proteaz ve gıda sanayinde kullanılan amilaz gibi endüstriyel enzimler için kullanılan konakçı mikroorganizmadır. İnklüzyon cisimciklerinin bulaşı olmadan protein ekspresyonuna olanak tanınabilmesi, genetik modifikasyona açık olması, kolay kültür şartları, yüksek verimlilik, metabolik olarak dayanıklı olması, fayda – maliyet dengesinin verimli olması gibi avantajları olan bu mikroorganizma FDA tarafından güvenli (GRAS) sınıfında kabul edilmiştir [91]. 5 tanesi ekstraselüler olmak üzere 7 bilinen proteaz enzimi bulunan *Bacillus subtilis'* in bu özelliği ile üretilen rekombinant proteinin parçalanmasına sebep olabileceği bildirilmektedir [92].

Saccharomyces cerevisiae

Bir maya ücresi olan *S. Cerevisiae E. Coli* içerisinde katlanma veya glikozilasyona ihtiyacı olması sebebiyle üretilemeyen proteinlerin çoğaltılmasına olanak tanır. Bu hücreler genetik olarak iyi karakterize edilmiştir ve birçok post-translasyonel modifikasyona olanak tanıması sebebiyle endüstride geniş kullanım alanına sahiptir [93].

Pichia pastoris

Büyümek için gereken tüm karbon ve enerjiyi metanolden elde edebilen canlılara metilotroflar denir. Bu mayalar tek karbon ve enerji kaynağı olarak metanol üzerinde yetiştirildiklerinde, metanol metabolizmasına dâhil olan enzimlerin üretimi güçlü bir şekilde indüklenir. Bunun sonucunda bu enzimleri içeren membran, peroksizom ve diğer organellerinde hızlı bir büyüme gözlenir. Bu da hücrenin kısa süre içersinde çoğalmasına olanak tanır [94]. Metilotrofik maya hücrelerinin hızlı bir şekilde yüksek yoğunluklara erişebilmelerinin yanında küçük modifikasyonlar ile ürün ekspresyonunun seviyesinin artırılabilir olması rekombinant proteinlerin endüstriyel üretimi için bu hücreleri konak mikroorganizma olarak cazip hale getirmiştirir [95]. Bilinen dört metilotrofik maya cinsi *Hansenula, Pichia, Candida* ve *Torulopsis)* vardır [96].

Metilotrofik mayaların bir diğer klonlama konakçısı olarak *S. cerevisiae*' ye göre avantajları arasında şunlar yer almaktadır: 1. daha yüksek protein verimliliği, 2. hiperglikozilasyon oranının nispeten düşük olması, 3. diğer mikroorganizmaların yaşamasının mümkün olmadığı yüksek konsantrasyonlardaki metanol çözeltilerinde üreyebilme, 4. uygun maliyetli kültür koşulları, 5. kolay transformasyon uygulanabilmesi olarak sıralanabilir [88].

Metilotrofik mayalar içerisinde bulunan *Pichia pastoris*, hücre dışı ortamda yüksek seviyelerde memeli rekombinant proteinleri üretme yeteneğine sahiptir. Bu yüzden 1970 li yıllarda insan ve hayvan beslenmesinde proteinden zengin gıda üretiminde kullanılmıştır [97]

P. pastoris, güçlü ve sıkı bir şekilde düzenlenen AOX1 (alkol oksidaz) promotörü kullanılarak heterolog bir protein ekspresyon sistemi olarak geliştirilmiştir [98]. Bu sistem yüksek miktarda ekstra selüler protein ekspresyonuna olanak tanır. Böylece proteinler hücre içerisinde birikerek yaratacağı toksik etkinin önüne geçilebilir. Bundan başka şaperonlar gibi yardımcı proteinlerin hedef protein oluşturulmadan önce ekspresyonu sağlanabilir. Promoter bölgelerinin regülasyonunu gösteren bir takım moleküller tanımlanmış olsa da gerçek mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. [99-102]

P. pastoris kültür ortamına uygun şekilde katlanmış ve katlanma sonrasında modifiye edilmiş aktif rekombinant proteinlerin yüksek titrelerini (130 g/L) üretebilmesi

sebebiyle protein üretim konakçısı olarak tercih edilir. Kural olarak, rekombinant üretilmek istenen protein, hücre içi veya hücre dışı olsun, *P. pastoris* kültür ortamında üreyeceği varsayılır. GFP (Green floresan protein) veya insan katalazı gibi tipik olarak hücre içi proteinlerin dahi üretimlerinin gerçekleştirilebildiği çalışmalar vardır [103, 104].

2.3.2 Vektöryel sistem seçimi

Pichia pastoris mikroorganizması için vektör seçiminde standart olarak çift fonksiyonlu sistemler tercih edilmelidir. Bunlar oksotrofik özelliklerden yararlanılarak ya da antibiyotik direnci kazanmasını mümkün kılacak vektöryel sistemler kullanılarak elde edilebilir. Bu sayede *E. coli* 'de replikasyonu, *P. pastoris*' te de ekspresyonu indükleme işlemi gerçekleşebilir [105]. Hem *E. coli* 'de hem de *P. pastoris*' te kullanılabilecek bir vektör olan pPICZ-α vektörü alkol oksidaz (AOX1) promotör bölgeye sahiptir. Bununla birlikte Zeocin direnç geni bulunan, C-terminal ucunda His-tag kodonu bulunan bu vektör *P. Pastoris* ekspresyon sisteminde oldukça yaygın kullanıma sahiptir [106].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyler Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nda 29.10.2018 – 09.12.2019 tarihleri arasında yürütülmüştür. Çalışma, 03.09.2018 tarihli 5224 sayılı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi ve 22.10.2018 tarihli 19/214 sayılı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile gerçekleştirilmiştir. Hastane rutin biyokimya laboratuvarına gelen ve istenen testler çalışılıp sonucu verildikten sonra atılacak serum örnekleri kullanılmıştır.

3.1 Gereç

3.1.1 Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz	Marka
Otomatik pipetler	CAPP, Almanya; Eppendorf, Almanya.
Distile su cihazı	Millipore Co., ABD
Ultra saf su cihazı	Sartarius Stedim Biotech, Almanya
Otoklav	Nüve Steamart, Türkiye
Hassas terazi	Daihan, Kore
Santrifüj	Hettich, Almanya; Nüve Steamart, Türkiye
Vorteks	Stuart, İngiltere
Isıtıcı blok	Denville Scientific, ABD
Buz makinesi	Scotsman, İtalya
Buzdolabı (+4˚C)	Beko, Türkiye
Derin dondurucu (-20˚C, -80˚C)	Uğur, Türkiye; Haier, Çin
pH metre	Hanna Instruments, ABD
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Orbital çalkalayıcı	Benchmark, ABD
İnkübatörlü çalkalayıcı	Benchmark, ABD
Isıl döngleyici (PCR cihazı)	Bio-Rad, ABD; Sacem, Türkiye
Etüv	Nüve, Türkiye
Çeker ocak	Vortice, İspanya
Yatay jel elektroforez sistemi	Major Science, ABD

Tablo 3.1(devamı) : Kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz	Marka
Jel görüntüleme sistemi	Fusion Fx7, Fransa
Dikey jel elektroforez sistemi	Major Science, ABD
Isıl döngleyici (PCR cihazı)	Bio-Rad, ABD; Sacem, Türkiye
UV-vis spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD; Biochrom, ABD
Orbital çalkalayıcı	Benchmark, ABD
Spektrofotometre	Schimadzu UV-1800 240V, Japonya
pH-metre	Milwaukee, Mi 151, Rocky Mount, ABD
Otomatize klinik kimya analizörü	Abbott Architect c8000 ve c16000i (Illinois, ABD)
Kuvartz küvet	ISOLAB Laborgeraete GmbH, Wertheim Almanya
Liyofilizatör	Labconco, ABD
Sonikatör	Qsonica, ABD

3.1.2 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve markaları Tablo 3.2 ‘de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan kimyasallar ve markaları.

Kimyasal	Marka
LB broth ve agar	Sigma-Aldrich, Almanya
Ampisilin	Sigma-Aldrich, Almanya
Zeocin	Invitrogen, ABD
Agaroz	Invitrogen, ABD
Kloramfenikol	Invitrogen, ABD
Etidyum bromür	EMD Millipore, Almanya
LB broth ve agar	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Almanya
DNA jel yükleme boyası	New England Biolabs, İngiltere
Absolüt Etanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
İzopropanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum asetat	Sigma-Aldrich, Almanya
Tris bazı	Thermo Fisher Scientific, ABD
α – ketoglutarik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
NADPH	Sigma-Aldrich, Almanya
β-Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Bovin Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Almanya
Tween 20	Sigma-Aldrich, Almanya
Glisin	Thermo Fisher Scientific, ABD
Coomassie blue boyası R250	Interchim, Fransa
N,N,N’,N2-tetrametileten-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Absolüt Etanol	Sigma-Aldrich, Almanya

Tablo 3.2 (devamı): Kullanılan kimyasallar ve markaları.

Kimyasal	Marka
Coomassie blue boyası R250	Interchim, Fransa
Akrilamid	Sigma-Aldrich, Almanya
N,N'–metilbisakrilamid	Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum sitrat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sitrik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Tris baz	Sigma-Aldrich, Almanya
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Almanya
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Almanya
Etilen glikol	Sigma-Aldrich, Almanya
Gliserol	Sigma-Aldrich, Almanya
ProClin 900	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum azid	Sigma-Aldrich, Almanya
İzositrat	Sigma-Aldrich, Almanya
Magnezyum klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Magnezyum sülfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Mangan sülfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Mangan klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Tergitol	Sigma-Aldrich, Almanya
Aseton	Sigma-Aldrich, Almanya
Teepol	Sigma-Aldrich, Almanya
Tween-80	Sigma-Aldrich, Almanya
Gliserol	Sigma-Aldrich, Almanya
Etanolamin	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum sülfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Kalsiyum klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum bikarbonat	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum fosfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Lityum klorid	Sigma-Aldrich, Almanya
YPD Broth	Bio Base, ABD
Yeast nitrogen base	Invitrogen, ABD
Yeast ekstrat	Sigma-Aldrich, Almanya
Trypton	Sigma-Aldrich, Almanya
Etilendaiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyumpersülfat (APS)	Sigma-Aldrich, Almanya

3.1.3 Ticari kitler ve enzimler

Çalışmada kullanılan ticari kitler ve enzimler Tablo 3.3 ‘de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan ticari kitler ve enzimler.

Kit adı	Marka
Genejet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, ABD
PureLink Genomic DNA Kits	Invitrogen, ABD
Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisfer Scientific, ABD
Ni-NTA Fast Start Kit	Qiagen, USA
Abbott Architect Urine/CSF Protein (7D79-21)	Illinois, ABD
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific, ABD
Sapphire AMP Fast PCR Master Mix	Takara, Japonya
Column-Pure™ PCR Clean-up Kit	Lamda Biotech, ABD
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel, Almanya
Alkalin Fosfataz enzimi	Thermo Fisher Scientific, ABD
Kit adı	Marka
Genejet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, ABD
PureLink Genomic DNA Kits	Invitrogen, ABD
T4 DNA ligaz	Thermo Fisher Scientific, ABD
İzositrat dehidrogenaz	Sigma-Aldrich, Almanya

3.1.4 Mikroorganizmalar

Shewanella putrefaciens CN-32 (ATCC BAA-453) (Invitrogen, ABD) suşu genetik kodun temini için kullanılmıştır.

Escherichia coli One Shot® Mach1™-T1R kompetan hücreleri (Thermo Fisher Scientific, ABD) vektör sisteminin klonlama konakçısı olarak kullanılmıştır.

Pichia Pastoris X-33 suşu (Thermo Fisher Scientific, ABD) istenen enzimin üretilmesi için protein ekspresyonu konakçısı olarak kullanılmıştır.

Escherichia coli One Shot® BL21 (DE3) hücreleri (Thermo Fisher Scientific, ABD) protein ekspresyonu konakçısı olarak kullanılmıştır.

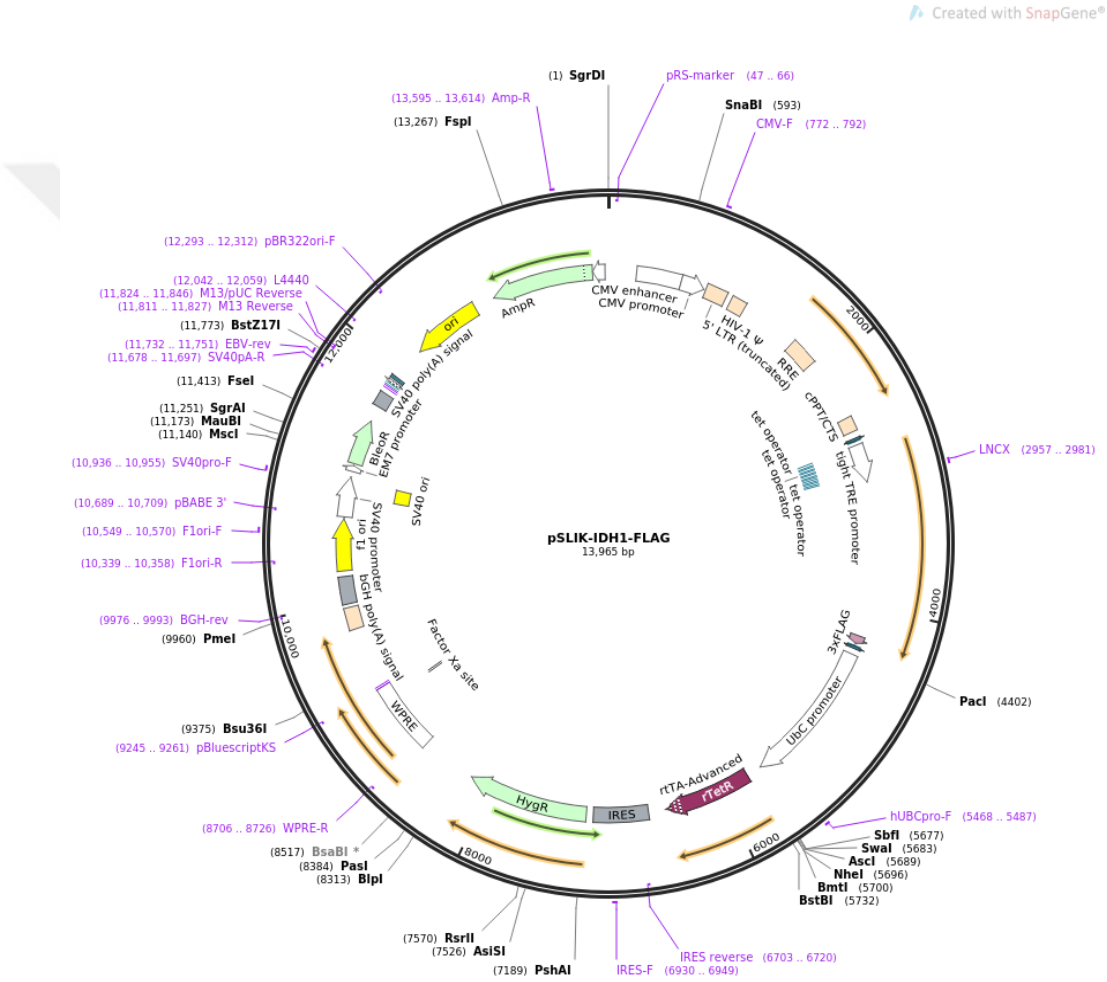
3.1.5 Primerler

Hedeflenen genetik bilginin çoğaltılması için kullanılan primerler Primer3 programı kullanılarak dizayn edilmiştir. *EcoR*I ve *Xho*I restriksiyon enzimlerinin tanıma

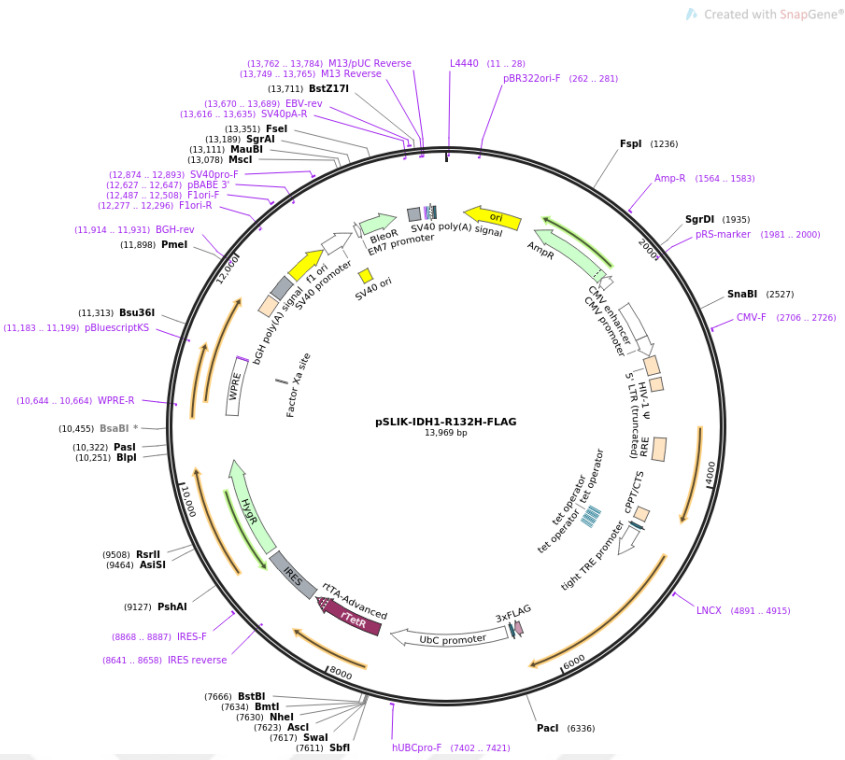
bölgelerini kodlayan primerler Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul) şirketinden temin edilmiştir.

3.1.6 Vektör sistemleri

R132H mutant IDH1 geninin kodlandığı pSLIK-IDH1-R132H-FLAG (Şekil 3.1) ve normal IDH1 geninin kodlandığı pSLIK-IDH1-FLAG (Şekil 3.2) plazmidleri Christian Metallo 'dan (Addgene plasmid # 66803; http://n2t.net/addgene:66803;RRID: Addgene_66803) ticari olarak temin edilmiştir.

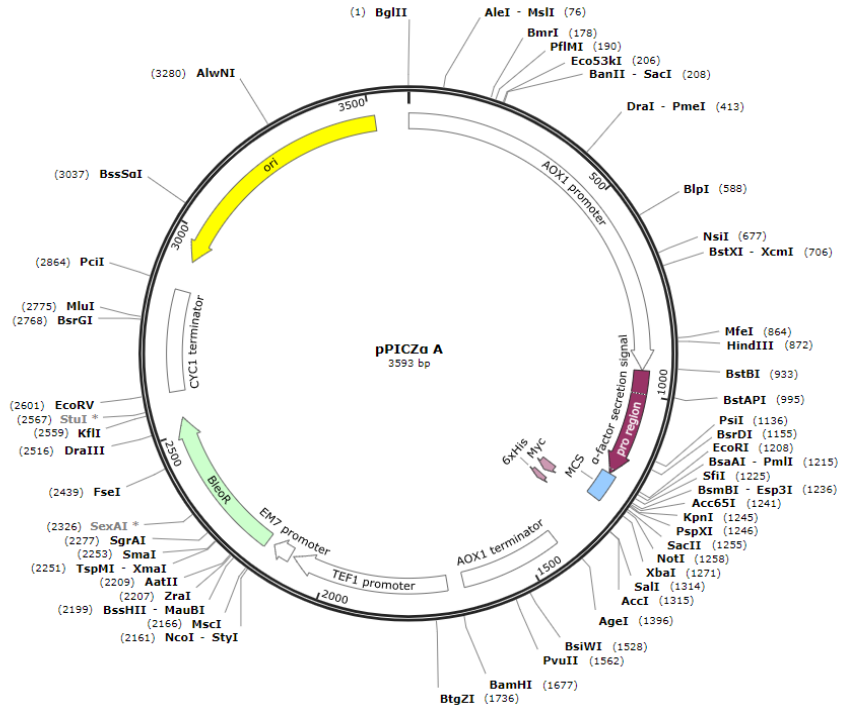


Şekil 3.1: pSLIK-IDH1-FLAG vektör haritası.



Şekil 3.2: pSLIK-IDH1-R132H-FLAG vektör haritası.

$NADP^+$- bağımlı IDH sentezi içinde hedef gen bölgesinin ekspresyon mikroorganizmasına aktarılması için ise pPICZ(alpha) A plazmid (Thermo Fisher Scientific, ABD) (Şekil 3.3) kullanılmıştır.

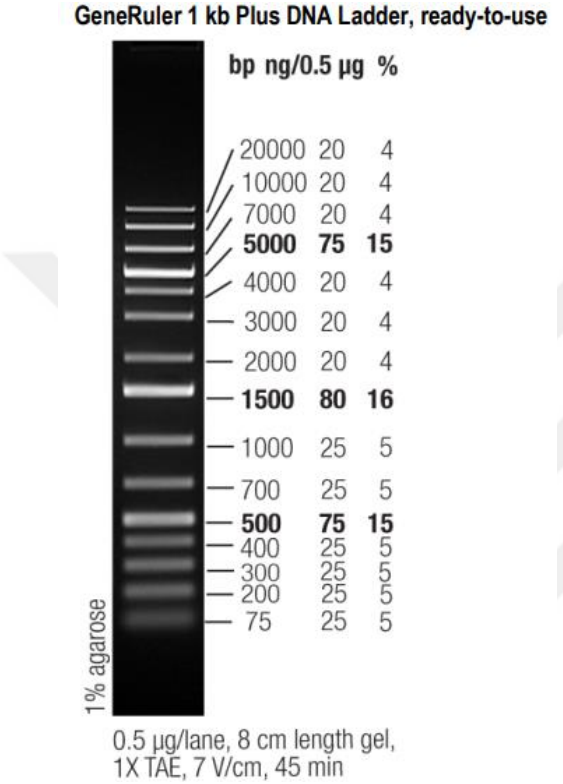


Şekil 3.3: pPICZα-A vektörü haritası.

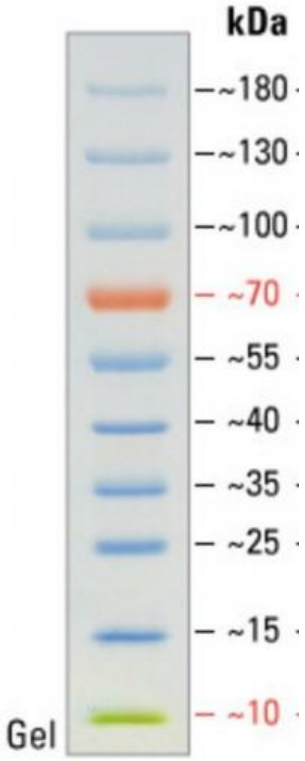
NAD^+- bağımlı IDH sentezi için pET28b-BE1(Thermo Fisher Scientific, ABD) vektörü kullanılmıştır.

3.1.7 DNA ve protein markırları

DNA markırı olarak "Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM1333)"(Şekil 3.4); Protein markırı olarak Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (SM#26616) (Şekil 3.5) kullanılmıştır.



Şekil 3.4: Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix (SM#1333).



Şekil 3.5: Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (SM#26616).

3.1.8 Hazırlanan besiyerleri ve diğer özellikli solüsyonlar

Ampisilin stok çözeltisi:

- 100 mg/ml stok çözeltisi olarak distile su ile hazırlanmıştır. Filtre edilerek küçük hacimlerde -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

LB Broth:

- 1 L distile su üzerine 20 g LB broth tozu eklenmiştir. 120˚C'de 20 dakika otoklavlanarak +4 ℃'de muhafaza edilmiştir.

Ampisilinli LB broth:

- 100 ml LB broth oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine ampisilin stok çözeltisinden 100 µl eklenmiş ve +4 ℃ 'de muhafaza edilmiştir.

LB agar:

- 6.5 g LB agar tozu 200 ml distile su üzerine eklenerek 121˚C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Sıcaklık yaklaşık 50˚C'ye düştüğünde eşit hacimlerde steril petri kaplarına dökülerek katı forma geçmesi beklenmiştir

Ampisilinli LB broth:

- Hazırlanan 200 ml LB broth besiyeri otoklavlanma aşamasından sonra sıcaklık yaklaşık 50˚C'ye düştüğünde 200 ml / 200 µl olacak şekilde ampsilin stok çözeltisinden eklenmiştir.

YPD broth: (200 ml için)

- 10 g yeast – pepton- dekstroz broth kimyasalı 200 ml dH_2O içerisinde çözülerek 20 dk 121 ℃ otoklavlanmıştır.

YPD agar: (1 lt için)

- 10 g yeast – pepton- dekstroz broth kimyasalı
- 4 g agar

Kimyasallar 1 lt distile suda çözdürülerek 20 dk 121 ℃ 0,5 bar' da otoklavlanmıştır. 50 – 60 ℃'ye geldiğinde plakalara dökülerek katılaşması beklenmiştir.

BMGY:

- % 2 Tripton
- % 1 yeast ekstrakt
- 100 mM potasyum fosfat pH = 6.0
- % 1,34 Yeast Nitrogen Base
- % 1 gliserol

BMMY:

- % 2 Tripton
- % 1 yeast ekstrakt
- 100 mM potasyum fosfat pH = 6.0
- % 1,34 Yeast Nitrogen Base
- % 0,5 metanol

Kimyasallar distile suda çözdürülerek 20 dk 121 ℃ 0,5 bar' da otoklavlanmıştır.

Jel elektroforezi çözeltileri

10X Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu:

- 24.2 g Tris bazı
- 1.75 g EDTA
- 5.7 ml asetik asit 500 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür.

%1 agaroz jel çözeltisi:

- 1 g agaroz
- 100 ml TAE tamponunda çözdürülüp üzerine 1 µl etidyum bromür eklenmiştir.

%40 poliakrilamid çözeltisi:

- 39 g akrilamid
- 1 g N,N'–metilbisakrilamid 100 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür.

%10 SDS çözeltisi:

- 10 g SDS tozunun 100 ml distile suda çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

%10 APS çözeltisi:

- 0.5 g APS tozunun 5 ml distile suda çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

10X, 1 L SDS-PAGE yürütme tampon çözeltisi:

- pH 8.3 olacak şekilde 30 g Tris bazı
- 144 g glisin
- 10 g SDS 1 L distile suda çözdürülmüştür. 1-10 dilüsyon yapılarak elektroforezde kullanılmışır.

Coomassie blue boyama çözeltisi:

- 0.1 g Coomassie R250
- 10 ml asetik asit
- 40 ml metanol distile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Boya çözücü (destaining) çözelti:

- 50 ml metanol
- 50 ml glasiyal asetik asit 400 ml distile su ile karıştırılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Rekombinant $NADP^+$- bağımlı enzimlerin üretimi

3.2.1.1 Genetik kodun temini ve genetik kodu barındıran mikroorganizmanın büyütülmesi

$NADP^+$-bağımlı - R132H mutant IDH1 geninin kodlandığı pSLIK-IDH1-R132H-FLAG vektörü ve $NADP^+$-bağımlı normal IDH1 geninin kodlandığı pSLIK-IDH1-FLAG vektörü Addgene plasmid firmasından (Christian Metallo, #66803 ; http://n2t.net/addgene:66803 ; RRID:Addgene_66803) ticari olarak temin edilmiştir. Jel agar içerisinde gelen hücreler vektör sisteminin protokolünde yer alan talimatlara uyularak ampisilinli 10 ml LB Broth besiyerine inoküle edilmiştir [107]. 37°C, 250 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Bulanıklık gözlenen kültür mayi 10 000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatan dökülerek hücrelerden oluşan pelletlerin LB agar plate e ekimi yapılmıştır. 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler 100 ml ampisilinli LB broth besiyerine inoküle edilerek karıştırıcılı inkübatörde 37°C, 250 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.2 Genetik kodu içeren vektör sisteminin pürifikasyonu

Yüksek hacimde üretilen pSLIK-IDH1-R132H-FLAG ve pSLIK-IDH1-FLAG plazmitleri inkübasyona bırakılan hücrelerden ertesi gün ticari olarak temin edilen Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile pürifiye edilmiştir. Ürünün protokolüne göre:

- Besiyeri içerisindeki hücrelerle birlikte 14000 rpm'de 3 dk döndürülerek üst fazı atılmıştır.
- Pelet üzerine 250 µl kit içerisinde yer alan "Resuspension Solution" eklenip tamamen homojen bir hale gelene kadar vorteks ile karıştırılmıştır.
- Daha sonra 250 µl "Lysis Solution" eklenip viskoz ve berrak bir görüntü elde edilene kadar tüp hafifçe alt üst edilmiştir.
- 350 µl "Neutralization Solution" eklendikten hemen sonra tüp 5-6 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Bulutsu bir forma geçen nötralize bakteri lizatı 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant "GeneJET spin column" kolonuna aktarılmıştır.

- 14000 rpm'de 1 dk santrifüjden sonra flow-through materyal atılmıştır.
- Kolonun üzerine 500 µl "Wash Solution" eklenip 14000 rpm'de tekrar 1 dk santrifüjlendikten sonra flow-through materyal atılmıştır. Yıkama işlemi iki defa tekrarlanmıştır. Geride "Wash Solution" kalmış olması ihtimaline karşı kolon 14000 rpm'de tekrar 3 dk döndürülmüştür.
- Temiz bir 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alınan kolonun üzerine 70°C'de ısıtılmış 50 µl "Elution Buffer" eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
- 14000 rpm'de 2 dk santrifüj sonucu flow-through materyalde bulunan plazmidlerin miktarı ve kalitesi nano-drop spektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.2.1.3 NADP$^+$-bağımlı R132H Mutant ve normal IDH1 genlerinin çoğaltılması için primer tasarımı

ATGTCCAAAAAAATCAGTGGCGGTTCTGTGGTAGAGATGCAAGGAGATGAAATGAC
ACGAATCATTTGGGAATTGATTAAAGAGAAACTCATTTTTCCCTACGTGGAATTGGA
TCTACATAGCTATGATTTAGGCATAGAGAATCGTGATGCCACCAACGACCAAGTCAC
CAAGGATGCTGCAGAAGCTATAAAGAAGCATAATGTTGGCGTCAAATGTGCCACTAT
CACTCCTGATGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGTTGAAACAAATGTGGAAATCAC
CAAATGGCACCATACGAAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCT
GCAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTC
ATGCTTATGGGGATCAATACAGAGCAACTGATTTTGTTGTTCCTGGGCCTGGAAAAG
TAGAGATAACCTACACACCAAGTGACGGAACCCAAAAGGTGACATACCTGGTACAT
AACTTTGAAGAAGGTGGTGGTGTTGCCATGGGGATGTATAATCAAGATAAGTCAATT
GAAGATTTTGCACACAGTTCCTTCCAAATGGCTCTGTCTAAGGGTTGGCCTTTGTATC
TGAGCACCAAAAACACTATTCTGAAGAAATATGATGGGCGTTTTAAAGACATCTTTC
AGGAGATATATGACAAGCAGTACAAGTCCCAGTTTGAAGCTCAAAAGATCTGGTAT
GAGCATAGGCTCATCGACGACATGGTGGCCCAAGCTATGAAATCAGAGGGAGGCTT
CATCTGGGCCTGTAAAAACTATGATGGTGACGTGCAGTCGGACTCTGTGGCCCAAGG
GTATGGCTCTCTCGGCATGATGACCAGCGTGCTGGTTTGTCCAGATGGCAAGACAGT
AGAAGCAGAGGCTGCCCACGGGACTGTAACCCGTCACTACCGCATGTACCAGAAAG
GACAGGAGACGTCCACCAATCCCATTGCTTCCATTTTTGCCTGGACCAGAGGGTTAG
CCCACAGAGCAAAGCTTGATAACAATAAAGAGCTTGCCTTCTTTGCAAATGCTTTGG
AAGAAGTCTCTATTGAGACAATTGAGGCTGGCTTCATGACCAAGGACTTGGCTGCTT
GCATTAAAGGTTTACCCAATGTGCAACGTTCTGACTACTTGAATACATTTGAGTTCAT
GGATAAACTTGGAGAAAACTTGAAGATCAAACTAGCTCAGGCCAAACTT

Şekil 3.6: 1242 bp uzunluğunda NADP$^+$-IDH genetik kodu.

NADP$^+$-IDH genetik kodu Şekil 3.6 'da gösterilmiştir. PCR aşamasında kullanılmak üzere Primer3 programı kullanılarak Forward ve Revers primerler tasarlanmıştır. Dizinin 5' ucuna "overhang" primer ile *Xho*I enzim tanıma bölgesi ve KR aminoasit dizileri eklenerek 'α-mating factor' ile inframe olması sağlanmıştır. 3' ucuna *EcoR*I enzim tanıma bölgesi eklenmiştir. Pimerler kullanım talimatına göre sulandırılmıştır. Forward ve reverse primerden küçük hacimlerde 1:1 oranında alınıp ayrı bir tüpte

karıştırılmış ve PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20℃ dolapta saklanmıştır. R132H mutasyonu gen dizisinin orta kısımlarında gerçekleştiği için mutant ve normal IDH1 gen bölgesinin çoğaltılması için aynı primerler kullanılmıştır.

IDH-1 gen dizisi için Sentromer DNA Teknolojileri firmasından satın alınan primerler:

Forward-primer: TTGAATTCAGTGGCGGTTCTGTG

Revers-primer: AATCTAGAAGTTTGGCCTGAGCTAGTTTGA

Çoğaltılarak pürifiye edilen DNA molekülleri kalıp olarak kullanılarak PCR ile $NADP^+$-bağımlı normal ve R132H mutant form IDH1 geninin çok sayıda kopyası elde edilmiştir. 'Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisfer Scientific, ABD) ürünü kullanılarak yazılı talimatlarına uygun şekilde PCR yapılmıştır.

Gerekli bileşenler ince cidarlı tüplerde Tablo 3.4'de belirtilen miktarlarda iyice karıştırıldıktan sonra Tablo 3.5 'de belirtilen sıcaklık ve sürelerde amplifiye edilmiştir.

Tablo 3.4: Normal ve R132H mutant IDH genomik DNA kalıplı PCR karışımı bileşenleri.

Bileşen	Miktar
2X Phusion HS II HF Master Mix	100 µl
Forward ve Revers Primer	10 µl
Genomik DNA	3 µl
dH_2O	87 µl
Toplam	200 µl

Tüm PCR hazırlık işlemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Phusion Flash PCR Master Mix tüpü kullanılmadan önce alt-üst karıştırılarak homojen olması sağlanmıştır.

Tablo 3.5: Normal ve R132H mutant IDH genomik DNA kalıplı PCR işlemi koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	98 ℃	30 sn	30 döngü
Denatürasyon	98 ℃	7 sn	
Bağlanma	66 ℃	20 sn	

Tablo 3.5 (devamı): Normal ve R132H mutant IDH genomik DNA kalıplı PCR işlemi koşulları.

Basamaklar	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Uzama	72 ℃	30 sn	
Son uzama	72 ℃	30 dk	

PCR tamamlandıktan sonra hedef gen bölgesinin doğru bir şekilde çoğalıp çoğalmadığını görmek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için %1'lik agaroz jel 5 µl DNA markırı ve 3 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılmış 10 µl PCR ürünü yüklenerek 150 mA, 110 V'de 20 dk yürütülmüştür. Sonrasında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa). İstenen bant büyüklüğü görüldükten sonra jele yüklenmeyen PCR ürünü (-20 ℃) dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2.1.4 Genetik kodun taşıyıcı vektöre aktarımı

$NADP^+$-bağımlı normal ve R132H mutant IDH1 genetik materyallerinin ekspresyonu için; lineer halde homolog rekombinasyon ile kromozoma AOX1 promotör bölgesinden entegre olabilen pPICZα-A plazmidi kullanılması planlanmıştır. Bu plazmidler içerdiği "α-mating factor" sekresyon sinyali sayesinde ekstraselüler üretime olanak tanır. PCR ürünleri olan normal ve R132H mutant IDH enzimlerine ait genetik materyal ve pPICZα-A vektörü *EcoR*1 ve *Xho*1 restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Bu aşamada 3 ayrı mikrosantrifüj tüpüne Tablo 3.6' da belirtilen bileşenler eklenmiştir.

Tablo 3.6: pPICZα-A vektörü ve PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.

Bileşen	Miktar
PCR ürünü / pPICZα vektörü	50 µl
EcoR1	5 µl
Xho1	5 µl
DNA	30 µl
Buffer	10 µl
Toplam	100 µl

Tablo 3.6 ‘da belirtilen miktarlarda pipetlenen tüplerde 37°C’de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim işlemi sonrası elde edilen materyaller ‘Column-Pure™ PCR Clean-up Kit (Lamda Biotech, ABD)’ protokolünde küçük değişiklikler uygulanarak pürifiye edilmiştir:

- 80 ml etanol 20 ml dH_2O ile karıştırılarak yıkama tamponu hazırlanmıştır.
- 500 µl yıkama tamponu il 100 µl PCR ürünü spin kolonla yüklenerek 10 000 rpm’de 1 dk mikrosantrifüj yapılmıştır.
- Flow-through materyal tekrar yüklenerek 10 000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Flow-through materyal atılarak 750µl yıkama tamponu ile 14 000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Yıkama tamponu kalıntısı kalmaması için flow-through materyal atılarak tekrar 2 dk 14 000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon yeni bir ependorf tüpe yerleştirilmiştir. 40 µl elüsyon tamponu yüklenerek 1 dk oda sıcaklığında beklenmiş ve 14 000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Flow-through materyal nano-drop spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boylarında kontrol edilmiştir.
- Materyal depolanmak üzere (-20 ℃) dondurucuya alınmıştır.

Pürifikasyonun ardından vektörün kendi üzerine kapanmaması için defosforilasyonu 5 µl alkalin fosfataz enzim ilavesi ile 37°C’de 10 dk inkübe edilerek yapılmıştır.
Fosfataz enzimi ile muamelenin ardından yalnızca vektörün olduğu tüp tekrar pürifikasyon aşamasından geçirilmiştir.

Ekspresyon plazmidi ve PCR ürünlerinin ligasyonu

PICZα-A vektörü ve PCR ürünlerinin ligasyonu Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Scientific, ABD) ile Tablo 3.7‘de belirtilen miktarlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.7: PICZα-A vektörü ve normal ve R132H mutant $NADP^+$- IDH1 PCR ürünlerinin ligasyonu.

	Normal $NADP^+$-IDH PCR genetik materyali	R132H mutant $NADP^+$-IDH genetik materyali	(-) kontrol
Insert edilecek DNA	2,5 µl	3,75 µl	-
Vektör	5 µl	5 µl	5 µl
T4 DNA ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
Ligasyon tamponu	4 µl	4 µl	4 µl
dH_2O	7,5 µl	6,25 µl	10 µl
Toplam	20 µl	20 µl	20 µl

Belirtilen miktarlar tüplere konduktan sonra tüpler vortekslenerek spin edilmiştir. 22 ℃ 'de 5 dk beklenerek transformasyonda kullanılmak üzere +4 ℃ buzdolabına kaldırılmıştır.

3.2.1.5 *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerine transformasyonu

Rekombinant pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin çoğaltılması için *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri kullanılmıştır. Transformasyon işlemi TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile hücreler kompetan hale getirilerek gerçekleştirilmiştir. Öncesinde 1.5 ml ampisilinli LB broth besiyerine 5 µl *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri steril koşullarda inoküle edilerek karıştırıcılı inkübatörde 37°C, 150 rpm'de over-night inkübasyona bırakılmıştır. pPICZα-A plazmidinde marker gen olarak Zeocin (Invitrogen, ABD) direnç geni bulunmaktadır. Bu sebeple plazmidi üretecek hücrelerin çoğalması için hazırlanan LB-agar besiyerine antibiyotik maddenin protokolünde önerilen miktarda (25 – 50 µg/ml) Zeocin eklenmiştir. 10 ml LB besiyerine 10 µl Zeocin konulmuştur.

Ertesi gün taze kültürden 200'er µl alınarak içerisinde 1,5 ml C-medium (Kit bileşeni) bulunan başka 2 ayrı tüpe aktarılmıştır. Karıştırıcılı inkübatörde 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 3 saat bekletilerek bulanıklık oluşması beklenmiştir. Kit içerisinde yer alan T-solution (A) ve T-solution (B) solüsyonları 500 µl 1/1 oranında karıştırılarak buz üstüne bekletilmiştir. Bulanıklık oluştuğu gözlenen kültür mayi 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Üst fazı dökülerek oluşan pellet üzerine 250 µl T solüsyonu karışımı eklenmiştir. Buz üzerinde 5 dk beklendikten sonra 12 000 rpm'de 1 dk

santrifüj edilerek üst fazı atılmıştır. Pellet üzerine tekrar 150 µl T solüsyonu karışımı eklenerek buz üzerinde 5 dk beklenmiştir. 10 µl ligasyon karışımı (pPICZα-A/IDH1 veya pPICZα-A/IDH1-R132H), 70 µl T solüsyonları ile bekletilmiş hücrelerden alınıp ayrı bir tüpte karıştırılarak buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir. Isıtılmış Zeocinli LB agar plaklara ekimi yapılarak 37 ℃'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan kolonilerden alınan sürüntüler 1 ml Zeocin içeren LB besiyeri içeren tüplere inoküle edilerek plazmid üretimi yapan bakterilerin üremesi sağlanmıştır. Normal ve R132H mutant genetik materyalleri içeren pPICZα-A vektörlerinin çoğaltılması amacıyla 5 mikrosantrifüj tüpüne farklı kolonilerden pPICZα-A/IDH1 (N_1, N_2, N_3, N_4, N_5), 5 mikrosantrifüj tüpüne ise farklı kolonilerden pPICZα-A/R132H-IDH1 (M_1, M_2, M_3, M_4, M_5) kolonileri konulmuştur. Karıştırıcılı inkübatörde 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 3 saat bekletilerek bulanıklık oluşması beklenmiştir. 3 saatin sonunda Sapphire AMP Fast PCR Master Mix (Takara, Japonya) kiti kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR işlemi reaktif miktarları ve koşulları Tablo 3.8 ve Tablo 3.9' da belirtilmiştir.

Tablo 3.8: pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/IDH1-R132H vektörleri için koloni PCR miktarları.

Bileşen	Miktar
SapphireAmp Fast PCR Master Mix (2X Premix)	12,5 µl
Forward ve Revers Primer	1 µl
Genomik DNA	1 µl
dH_2O	10,5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.9: pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/IDH1-R132H vektörleri için koloni PCR koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	94 ℃	1 dk	1
Denatürasyon	98 ℃	7 sn	
Bağlanma	66 ℃	5 sn	30 döngü
Uzama	72 ℃	15 sn	

PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi ve elektroforez uygulanmıştır. %1'lik agaroz jel 5 µl DNA markırı ve 3 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılmış 10 µl PCR ürünü yüklenerek 170 mA, 110 V'de 20 dk yürütülmüştür. Sonrasında jel görüntüleme

sisteminde görüntülenmiştir (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa). Bu aşamada hedef bant oluşumu gözlenen N_1, N_3, N_5 ve M_1, M_2, M_4, M_5 kolonileri içeren tüplerden önce 100'er µl alınarak temiz bir mikrosantrifüj tüpünde +4 °C'ye kaldırılmıştır.

Hedef ürün oluşumu gözlenen M_1 ve N_3 kolonilerinden büyük miktar (10 ml) besiyerinde üretimi gerçekleştirilerek plazmid pürifikasyonu yapılmıştır.

3.2.1.6 pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/IDH1-R132H plazmid pürifikasyonu

Bu işlem için Column Pure Plasmid Miniprep Kit (Lamda Biotech, ABD) kullanılmıştır. Yazılı protokolde küçük değişiklikler uygulanarak aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Over-night bırakılan bakteri kültürleri santrifüj edilerek oluşan pelletler 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 100 µl solüsyon 1 eklenerek resüspende edilmiştir.
- 1 µl visual lyse eklenmiştir.
- 200 µl solüsyon 2 eklenerek nazik bir şekilde karıştırılmıştır. 1 dk beklenerek mavi renk oluşumu gözlenmiştir.
- 350 µl solution 3 eklenerek nazik bir şekilde karıştırılmıştır. 1 dk beklenerek oluşan mavi rengin beyaz pellete dönüşümü gözlemlenmiştir.
- 5 dk 14 000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatan spin kolona transfer edilerek 2 dk 1 dk santrifüj edilmiş, Flow-through materyal atılmıştır.
- 750 µl yıkama solüsyonu eklenerek 1 dk santrifüj edilmiştir. Flow-through materyal atılmıştır. Bu basamak bir kez daha tekrarlanmıştır.
- Kalıntı yıkama solüsyonu kalmaması açısından 1 dk ek santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon temiz bir ependorfa oturtularak 50 µl elüsyon tamponu eklenmiştir. 10 000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Flow-through materyal UV-vis spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boylarında kontrol edilmiştir.
- Materyal depolanmak üzere (-20 °C) dondurucuya alınmıştır.

3.2.1.7 pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin kontrol edilmesi

Koloni PCR ürünleri olan pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin Zeocin içeren selektif mediumda üretilmesi, PCR ile üretiminin doğrulanması önceki basamaklarda gerçekleştirilmiştir. Tekrar doğrulama amacıyla restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi yapılmıştır.

Tablo 3.10: pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin kesilmesi.

Bileşen	Miktar
Tampon	2,5 µl
*EcoR*I	1 µl
*Xho*I	1 µl
H_2O	10,5 µl
DNA	10 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.10 da belirtilen miktarlarda ürün mikrosantrifüj tüplerine konarak 37 ℃' de 10 dk thermal cycler da inkübe edilmiştir.

%1'lik agaroz jel 5 µl DNA markırı ve 3 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılmış 10 µl PCR ürünü yüklenerek 170 mA, 110 V'de 20 dk yürütülmüştür. Sonrasında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa). İstenen bant büyüklükleri görüldükten sonra jele yüklenmeyen PCR ürünü (-20 ℃) dondurucuya kaldırılmıştır

3.2.1.8 pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin *Pichia Pastoris*'e transformasyonu

Pichia Pastoris X-33 suşuna Li-Cl-PEG protokolü ile transformasyon gerçekleştirilmiştir. Normalde *Saccharomyces cerevisiae* için geliştirilmiş bu teknik küçük değişiklikler yapılarak yazılı şekilde uygulanmıştır [108].

***Pichia Pastoris* hücrelerinin üretilmesi**

-80 ℃ 'de depolanan *Pichia Pastoris* hücreleri steril falkon tüp içerisinde 10 ml YPD broth sıvı besiyerine 10 µl ekilerek 30 ℃' de ağzı açık şekilde 250 rpm'de inkübasona bırakılmıştır. Bulanıklık oluştuğu gözlenen falkon tüp 10 000 rpm'de 5 dk döndürülerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Oluşan pellet YPD agar katı besiyerine ekilmiştir. 30 ℃' de 96 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Falkon tüplere 50'şer ml

YPD broth besiyeri konarak plakalardan her bir tüpe 1 koloni gelecek şekilde inoküle edilmiştir. 30°C sıcaklık ve 250 rpm karıştırma koşullarındaki çalkalamalı inkübatörde gece boyu bekletilmiştir.

pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin transformasyona uygun hale getirilmesi

Belirtilen protokolüne uygun kullanılan *Sac*I enzimi (Thermo Scientific, ABD) ile kesilerek sirküler halden lineer hale geçen plazmidlerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Almanya) kiti kullanılmıştır. Protokolünde yazılı basamaklarda küçük değişiklikler yapılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

- 100 µL PCR karışımı ve 200 µL NTI tamponu bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırılarak DNA bağlanması gerçekleştirilmiştir.
- Kit içerisinde bulunan spin kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne konarak NTI tamponu + PCR karışımı kolona pipetlenmiştir.
- 10 000 rpm'de 30 sn santrifüj edilerek flow-through materyal atılmıştır.
- Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak 100 µl elüsyon tamponu konarak 1 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 10 000 rpm' de 1 dk santrifüj edilerek flow-through materyal transformasyonda kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

***Pichia pastoris* hücrelerinin kompetan hale getirilmesi**

- 50 ml YPD agar besiyeri içerisinde *Pichia* hücreleri 30 °C'de OD_{600} 3 – 4 arasında olacak şekilde inkübe edilmiştir.
- Hücreler 8000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek üst fazı atılmıştır.
- 25 ml dH_2O ile resüspende edilerek 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Üst faz atılarak pellet 1 ml 100 mM LiCl içerisinde çözülüştür.
- Çözelti temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Tüp maksimum hızda 15 sn santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır.
- Üst faz pipetle dikkatli bir şekilde alınmıştır.
- Pellet 400 µl 100 mM LiCl içerisinde çözülmüştür.
- Oluşan çözelti 50 µl'lik hacimler olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine ayrılmıştır

- LiCl – hücre karışımı bulunan tüpler santrifüj edilerek üst fazındaki LiCl uzaklaştırılmıştır.

Transformasyon aşaması

- Her bir tüpe Tablo 3.11' de belirtilen bileşenler eklenerek yaklaşık 1 dk karışım homojen görüntü alıncaya kadar kuvvetli bir şekilde vortekslenmiştir.

Tablo 3.11: Transformasyon bileşenleri.

Bileşen	Miktar
% 50'lik PEG-600	240 µl
1 M LiCl	36 µl
2 mg/ml tek zincirli DNA	25 µl
Plazmid	50 µl

- Tüpler 30 ℃'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- 42 ℃'de 25 dk bekletilerek ısı-şoku uygulanmıştır.
- 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek üst fazı dökülmüştür.
- Pelletler tekrar 1 ml YPD besiyerinde çözülerek 30 ℃'de 1 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

1 saatin sonunda 100 'er µl stok kültür olarak -20 ℃' dolaba kaldırılmıştır. Aynı karışımdan 200 µg/mL Zeocin içeren YPD agar plakalara 25 µl ekimi yapılarak 96 saatlik 30 ℃ de inkübasyona bırakılmıştır.

Transformasyon işleminin doğrulanması

Selektif besi yerinde çoğaltılan *Pichia pastoris* hücrelerine pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerinin girdiğinin tekrar doğrulamak için koloni PCR yapılmıştır. Bu doğrultuda maya genomik DNA eldesi için hücre duvarını parçalama amacıyla Tablo 3.12' de belirtilen konsantrasyonda bileşenlerden oluşan karışım maya lizat tamponu olarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.12: Maya lizat tamponu bileşenleri.

Bileşen	Konsantrasyon
Triton X-100	% 2
SDS	% 1
NaAc	0,2 M
LiCl	200 mM

***Pichia Pastoris* hücrelerinin hücre duvarının parçalanması**

- Transformasyon yapılan maya hücreleri zeosinli YPD agar petri kaplarına inoküle edilerek 96 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.
- Oluşan kolonilerden 1 ml YPD sıvı besiyerine ekim yapılarak kısa süreli (30 ℃ 'de 24 saat) inkübasyona bırakılmıştır.
- 24 saat sonunda tüpler santrifüj edilerek üst fazı atılmıştır.
- Pelletler üzerine Tablo 3.12 de belirtilen tampondan 500 µl konarak vortekslenmiştir.
- 70 ℃ 'de her 20 dk da bir vortekslenerek 1 saat bekletilmiştir.
- 1 saatin sonunda tüplere 1500 µl %96-100'lük etanol pipetlenmiştir.
- Tüpler 1-2 dk alt-üst edilerek karıştırılmıştır.
- 15 000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üst fazları dikkatli bir şekilde alınmıştır.
- Alkolü uçurarak kurutmak için ısıtıcı blokta 50 ℃ 'de 10 dk bekletilmiştir.
- Tüplere 100'er µl dH_2O konarak pelletin çözülmesi sağlanmıştır.
- Vortekslenerek tüpler tekrar santrifüj edilerek pellet çöktürülmüştür.
- Üst fazdan önce UV-vis spektrofotometre ile DNA ölçümü yapılmıştır.
- Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisfer Scientific, ABD) ürünü kullanılarak Tablo 3.13 ve Tablo 3.14 **'**de yazılı talimatlarına uygun şekilde PCR yapılmıştır.

Tablo 3.13: *Pichia pastoris* koloni PCR bileşenleri.

Bileşen	Miktar
2X Phusion HS II HF Master Mix	10 µl
Forward ve Revers Primer	0,6 µl
Genomik DNA	2 µl
dH_2O	7,4 µl
Toplam	22 µl

Tablo 3.14: *Pichia pastoris* koloni PCR koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95 ℃	1 dk	
Denatürasyon	98 ℃	7 sn	
Bağlanma	66 ℃	15 sn	35 döngü
Uzama	72 ℃	40 sn	
Son uzama	72 ℃	30 dk	

3.2.1.9 Protein Ekspresyonunun İndüksiyonu

96 saatlik inkübasyona bırakılan rekombinant *Pichia pastoris* kolonilerinden zeocinli agarda üreme gösteren kolonilerinde seçilerek 3 ml YPD broth içinde üremesi sağlanmıştır. 250 rpm'de 30℃'de inkübe edilen hücreler 1 gün sonunda santrifüj ile çöktürülerek 50 ml YPD broth içerisine alınmıştır. 30 ℃'de OD_{600} 3 – 4 arasında olacak şekilde hücrelerin proliferasyonu sağlanmıştır. İstenen yoğunluğa ulaşan hücreler 10 000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen pellet 50 ml BMGY agarda 1 gün boyunca 250 rpm'de 30 ℃'de karıştırıcılı inkübatörde bekletilmiştir. 1 günün sonunda 10 000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır. Üst fazı dökülerek oluşan pellet 50 ml BMMY agarda 72 saat boyunca 250 rpm'de 30 ℃ 'de inkübe edilmiştir. Her 24 saatte bir 500 µl metanol ilave edilmiştir. Metanol ilave edilmeden önce SDS-PAGE analizi için kültür ortamından 500 µl alınarak +4 ℃ dolaba kaldırılmıştır.

3.2.1.10 Üretilen enzimlerin stabilite testleri için depo edilmesi

96 saatlik inkübasyon sonrası besiyerinde $NADP^+$-bağımlı IDH1 ve $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enzimlerinin olduğu varsayılmıştır. Kültür mayi santrifüj edilerek süpernatandan 1'er ml mikrosantrifüj tüplerine ayrılmıştır. 1/1 oranda PBS/kültür mayi, 1/1 oranda gliserol/kültür mayi hacimlerde hazırlanan karışımlar stabilite açısından +4 ℃ ve – 20 ℃ dolapta muhafaza edilmek üzere kaldırılmıştır. 10 ml kültür mayi süpernatanı liyofilizasyona tabi tutularak 1/10 oranında konsantre edilmiştir. Liyofilize edilmeyen kalan kültür mayiden alınan örnekler +4 ℃ ve – 20 ℃ dolaba kaldırılmıştır.

3.2.2 Rekombinant NAD^+-bağımlı enzimin üretimi

3.2.2.1 Genetik kodun temini

Shewanella putrefaciens bakterisinde iteratürde E.coli, *Helicobacter pylori, Bacillus subtilis* ve *Staphlococcus aureus* mikroorganizmalarından izole edilen IDH genetik

dizileri PRK08997ile yüksek oranda homoloji gösteren bir bölge tespit edilmiştir. Bu bölgenin rekombinant olarak ekspresyonu sonucu NAD^+-IDH enziminin üretileceği düşünülmüştür. NCBI reference sequence database ile tespit edilen *S. Putrefaciens* DNA dizisi içerisinden IDH genetik kodunu çoğaltılması amacıyla Primer3 programı kullanılarak uygun primerler dizayn edilmiştir.

Forward primer: 5′-TACATATGTCAAAAAGAACGATAACCGTA- 3′

Reverse primer: 5′-TTCTCGAGACCATGCAGACG-3′

Primerler kullanım talimatına göre sulandırılmıştır. Forward ve reverse primerden küçük hacimlerde 1:1 oranında alınıp ayrı bir tüpte karıştırılmış ve PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere - 20℃ dolapta saklanmıştır. 80 °C ‘de % 20 gliserol içerisinde muhafaza edilen *S. putrefaciens* hücreleri ampisilin içeren LB medium içerisinde 37°C ‘de 250 rpm ‘de 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. ‘Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisfer Scientific, ABD) ürünü kullanılarak yazılı talimatlarına uygun şekilde Tablo 3.15 ve Tablo 3.16 koşullarında PCR yapılmıştır.

Tablo 3.15: *S. putrefaciens* PCR bileşenleri.

Bileşen	Miktar
2X Phusion HS II HF Master Mix	10 µl
Forward ve Revers Primer	0,6 µl
Genomik DNA	2 µl
dH_2O	7,4 µl
Toplam	22 µl

Tablo 3.16: *S. putrefaciens* PCR koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	98 ℃	30 sn	
Denatürasyon	98 ℃	5 sn	
Bağlanma	68 ℃	20 sn	35 döngü
Uzama	72 ℃	60 sn	
Son uzama	72 ℃	5 dk	

Elde edilen PCR ürününün 1248 bp uzunluğunda olduğu % 1’lik agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

3.2.2.2 NAD^+-bağımlı IDH genetik kodunun pET-28b(+) vektörüne aktarılması

Ekspresyon vektörü olarak kullanılacak olan pET-28b(+) vektörü *Nde*I ve *Xho*I restrüksiyon enzimleri ile 37 °C de 10 dk bekletilmiştir.

Tablo 3.17: Ekspresyon plazmidi ve PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.

Bileşen	Miktar
PCR ürünü / pET-28b(+) vektörü	50 µl
*Nde*I	5 µl
*Xho*I	5 µl
DNA	30 µl
Buffer	10 µl
Toplam	100 µl

pET-28b(+) vektörü ve PCR ürünlerinin ligasyonu Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Scientific, ABD) ile Tablo 3.18'de Belirtilen miktarlar tüplere konduktan sonra tüpler vortekslenerek spin edilmiştir. 22 ℃ 'de 5 dk beklenerek transformasyonda kullanılmak üzere +4 ℃ buzdolabına kaldırılmıştır.

Tablo 3.18: PCR ürünü / pET-28b(+) vektörü ligasyon işlemi bileşenleri.

	Normal IDH PCR genetik materyali	R132H mutant IDH genetik materyali	(-) kontrol
Insert edilecek DNA	2,5 µl	3,75 µl	-
Vektör	5 µl	5 µl	5 µl
T4 DNA ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
Ligasyon tamponu	4 µl	4 µl	4 µl
dH_2O	7,5 µl	6,25 µl	10 µl
Toplam	20 µl	20 µl	20 µl

PCR ürününün vektöre klonlanması aşamalarında baz dizilerinde olabilecek ve eksprese edilecek proteinin aktivitesini etkileyebilecek mutasyonları belirlemek amacıyla dizi analizi gerçekleştirilmiştir. PCR ürününü alarak rekombinant olan pET-28b(+) vektörü BM Laboratuvar Sistemleri (Ankara) firmasına dizi analizine gönderilmiş ve ligasyon ve PCR işlemlerinin doğrulaması yapılmıştır.

3.2.2.3 Rekombinant pET28b/SpIDH plazmidinin çoğaltılması

Rekombinant pET28a-SpIDH vektörlerinin çoğaltılması için *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri kullanılmıştır. Transformasyon işlemi TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile hücreler kompetan hale getirilerek gerçekleştirilmiştir. Öncesinde 1.5 ml 100 µg/ml ampisilin, 25 µg/ml kloramfenikol LB broth besiyerine 5 µl *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri steril koşullarda inoküle edilerek karıştırıcılı inkübatörde 37°C, 150 rpm'de over-night inkübasyona bırakılmıştır.

Ertesi gün taze kültürden 200'er µl alınarak içerisinde 1,5 ml kit bileşeni olan C-medium bulunan başka tüpe aktarılmıştır. Karıştırıcılı inkübatörde 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 3 saat bekletilerek bulanıklık oluşması beklenmiştir. Kit içerisinde yer alan T-solution (A) ve T-solution (B) solüsyonları 500 µl 1/1 oranında karıştırılarak buz üstüne bekletilmiştir. Bulanıklık oluştuğu gözlenen kültür mayi 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Üst fazı dökülerek oluşan pellet üzerine 250 µl T solüsyonu karışımı eklenmiştir. Buz üzerinde 5 dk beklendikten sonra 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek üst fazı atılmıştır. Pellet üzerine tekrar 150 µl T solüsyonu karışımı eklenerek buz üzerinde 5 dk beklenmiştir. 10 µl ligasyon karışımı (pET28a-SpIDH), 70 µl T solüsyonları ile bekletilmiş hücrelerden alınıp ayrı bir tüpte karıştırılarak buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir. Isıtılmış ampisilin ve kloramfenikollü LB agar plaklara ekimi yapılarak 37 ℃'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan kolonilerden alınan sürüntüler 1 ml ampisilin ve kloramfenikol içeren LB besiyeri içeren tüplere inoküle edilerek plazmid üretimi yapan bakterilerin üremesi sağlanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında kültür medyumundan Column Pure Plasmid Miniprep Kit (Lamda Biotech, ABD) kullanılarak plazmit pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Yazılı protokolde küçük değişiklikler uygulanarak aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Over-night bırakılan bakteri kültürleri santrifüj edilerek oluşan pelletler 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 100 µl solüsyon 1 eklenerek tekrar çözdürülmüştür.
- 1 µl visual lyse eklenmiştir.
- 200 µl solüsyon 2 eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. Mavi renk oluşumu gözlenene kadar beklenmiştir (1dk).

- 350 µl solüsyon 3 eklenerek nazik bir şekilde karıştırılmıştır. 1 dk beklenerek oluşan mavi rengin beyaz pellete dönüşümü gözlemlenmiştir.
- 5 dk 14 000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatan spin kolona transfer edilerek 2 dk santrifüj edilmiş, flow-through materyal atılmıştır.
- 750 µl yıkama solüsyonu eklenerek 1 dk santrifüj edilmiştir. Flow-through materyal atılmıştır. Bu basamak bir kez daha tekrarlanmıştır.
- Solüsyon kalmaması açısından 1 dk daha döndürümüştür.
- Spin kolon temiz bir ependorfa oturtularak 50 µl elüsyon tamponu eklenmiştir. 10 000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Flow-through materyal nano drop spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boylarında kontrol edilmiştir.
- Materyal depolanmak üzere (-20 ℃) dondurucuya alınmıştır.

3.2.2.4 Rekombinant pET28b/ NAD^+-SpIDH plazmidinin ekspresyon konağına aktarılması

Rekombinant pET28b/NAD^+-SpIDH vektörünün ekspresyon konağı olarak kullanılacak *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla "TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, #K2710)" kullanılmıştır. *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerinin transformasyonu için yapılan tüm işlemler E. coli One Shot® BL21 (DE3) hücreleri içinde tekrarlanmıştır. Seçici besiyeri olan 100 µg/ml ampisilin, 25 µg/ml kloramfenikol LB agar plaklara ekimi gerçekleştirilen bakteriler 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kolonilerden seçilerek 1.5 ml'lik ampisilinli ve kloramfenikollü LB broth besiyerine ekilmiş, inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bulanıklık gözlendiğinde kültürden 100 µl alınıp üzerine %50 gliserol içerisinde daha sonra kullanılmak üzere -80°C dolaba kaldırılmıştır.

Taze kültürü yapılan hücreler yüksek miktarda üretebilmek için 50 ml'lik ampisilinli ve kloramfenikollü LB broth besiyerinde inkübe edilmiştir. Oluşan kültürden 1/100 oranında 250 ml antibiyotiksiz LB broth besiyerine inoküle edilerek inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 3 saat inkübe edilmiştir. Spektrofotometre ile ölçülen OD_{600} 0.5 olarak ölçüldüğünde kültür mayiden 1 ml numune alınarak 12000

rpm'de 5 dk santrifüj edilerek pelletleri SDS-PAGE analizi için -20 °C ye kaldırılmıştır. Kalan kültür mayisine protein ekspresyonunu indükleme amacıyla 0.7 mM IPTG eklenerek 37°C, 250 rpm'de 3 saat inkübe edilmiştir. 1. saat ve 3. saatlerde alınan 1 ml olarak alınan örnekler 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek pelletleri SDS-PAGE analizi için -20 °C ye kaldırılmıştır.

3.2.2.5 Klonlanan NAD^+-SpIDH enziminin pürifikasyonu

Büyük miktarda üretilen hücreler 50 ml'lik falkon tüplere ayrılarak 14 000 rpm 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatan atılarak oluşan pellet üzerinde 2 ml Tablo 3.19 'da belirtilen lizis tamponu eklenerek pipetleme ve vorteksle homojenize edilmiş, peletlerin tamamen çözdürülmesi ile tüm lizatlar tek bir falkonda toplanmıştır.

Tablo 3.19: *E. coli* hücreleri lizis tamponu bileşenleri.

Lizis Tamponu
250 mM NaCl
1 mg/ml DNaz I
100 mM Tris–HCl pH 8.0

%96 güç, 15 sn puls, 15 sn ara, 4 döngü ile buz üzerinde sonikasyona tabi tutulan materyal tekrar 10 000 rpm 'de 25 dk santrifüj edilerek üst fazı ayrılmıştır. Süpernatan materyal "Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, USA)" kullanılarak yazılı protokolüne uygun bir şekilde pürifikasyona tabi tutulmuştur. 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek temiz bir falkon tüpte toplanmıştır. Örneğin üzerine kit içeriğinde bulunan 10 ml "Native Lysis Buffer" eklenmiş ve ardından tekrar filtreden geçirilmiştir. Hücre lizatı kit içerisinde bulunan kolon tüplerinden vakum ile aktarımı gerçekleştirilmiştir. Kolon, 4 ml "Native Wash Buffer" ile iki defa yıkanmıştır. His-etiketli NAD^+-SpIDH proteini, 2 ml "Native Elution Buffer" ile bağlanmış olduğu kolondan ayrılmıştır. Elde edilen saf 2 ml NAD^+-SpIDH proteini içeren çözeltiden 100 µl SDS-PAGE için ayrılmıştır. Kalan çözeltiden benzetonyum klorit çöktürme yöntemiyle Abbott Architech C8000 cihazı üzerinde "Abbott Architect Urine/CSF Protein (7D79-21)" kiti kullanılarak yazılı protokolüne uygun şekilde protein miktar tayini yapılmıştır.

3.2.2.6 Üretilen enzimin stabilite testleri için depo edilmesi

100 µl 'si SDS-PAGE analizi için ayrılan pürifikasyon materyalinden 1300 µl %50 gliserol içerisine, 500 µl % 50 PBS içerisine 100 µl saf haliyle - 20°C dolaba kaldırılmıştır.

3.2.2.7 SDS-PAGE analizi

SDS-PAGE analizi için %10'luk ayırma (separating) jeli ve %5'lik yükleme (stacking) jeli **Tablo 3.20** de belirtilen miktarlarda hazırlanmıştır.

Tablo 3.20: SDS-PAGE analizi için hazırlanan jellerin içeriği.

Bileşen	Ayırma jelinde bulunan miktar (ml)	Yükleme jelinde bulunan miktar (ml)
% 30 poliakrilamid	1.3	3.3
1 M Tris T (pH 8.8)	2.5	-
1 M Tris T (pH 6.8)	-	2.5
% 10 SDS	0.1	0.1
dH_2O	4.1	6.1
% 10 APS	0.1	0.1
TEMED	0.01	0.01
Toplam	20	4

NAD^+ ve $NADP^+$-bağımlı IDH enzimlerini ekspresyonu yaptıklarını doğrulama amacıyla BMMY medyum ile indüklenen *Pichia pastoris X33* maya hücrelerinin günlük alınan, IPTG ile indüklenen *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücre kültüründen ise saatlik alınan örnekler poliakrilamid jel üzerindeki kuyucuklara yüklenmiştir. 100 µl örnek, 100 µl vortkeslenerek karıştırılmıştır. . Protein markırından 20 µl, 2X Laemmli buffer 20 µl vortekslenerek karıştırılmıştır. Örnekler ve markır ısıtıcı blok üzerinde bulunan kaynatılmış suyun olduğu bir kapta 5 dk, hemen ardından buz üstünde de 5 dk inkübe edilerek jele yüklemek için hazır hale getirilmiştir. Örnekler ve markör 20 µl olarak jel üzerindeki kuyucuklara yüklendikten sonra elektroforez tankı 1X SDS-PAGE yürütme tampon çözeltisi ile doldurularak 120 mA, 150 V'de 1 saat yürütülmüştür. Elektroforez bittikten sonra cam kasetlerden çıkarılan jel ile jelin üzerini kaplayacak miktarda eklenen Coomassie blue boyama çözeltisi çalkalayıcı üzerinde 50 rpm'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından boyama çözeltisi dökülerek jelin üzerine yüzeyini kaplayacak miktarda boya giderici (destaining) çözelti eklenmiş ve 50 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2.8 Rekombinant üretilen NAD^+-SpIDH, $NADP^+$-bağımlı normal ve $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH enzimlerinin aktivite çalışmaları

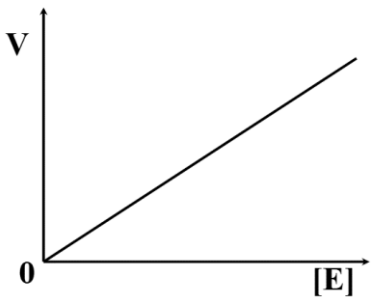
Bir enzimin maksimum aktiviteyi göstermesi için sağlanması gereken bir takım koşullar vardır. Enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, ışık, ürün konsantrasyonu, kofaktör ve koenzimlerin konsantrasyonu, modülatör ve inhibitörlerin konsantrasyonu, iyonik denge gibi bir takım parametreler enzimin maksimum aktivite göstermesi için optimize edilmelidir.

Enzimin aktivitesini tanımlayan farklı terimler bulunur:

- Katalitik aktivite: Bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda (saniye) ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına, enzime ait dönüşüm sayısı (veya molar katalitik aktivite) denir ve kısaca k_{cat} sembolü ile gösterilir [109].
- International Unit (IU): En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi IU'dir. 1 dakikada 1 μmol substratın ürüne dönüşümünü katalize eden enzim miktarını ifade eder.
- Katal: Enzim aktivitesi, bazen de katal olarak ifade edilmektedir. 1 katal enzim aktivitesi, optimal koşullarda, 1 saniyede 1 mol substratın ürüne dönüşümünü katalize eden enzim miktarını ifade eder.
- Spesifik aktivite: Enzim aktivitesi, spesifik aktivite olarak da ifade edilir. Spesifik aktivite mg protein başına düşen enzim aktivitesidir[110].

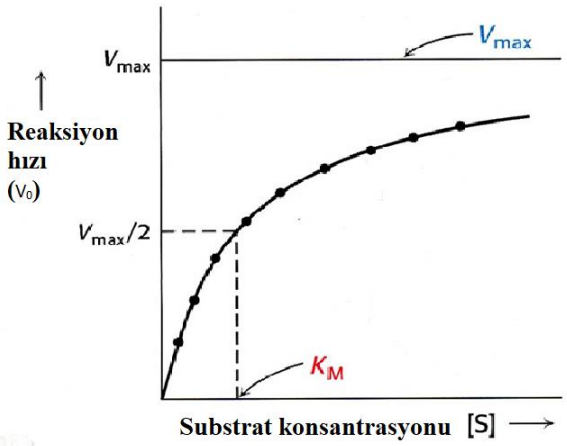
Enzim aktivitesini etkileyen faktörler:

1. Enzim konsantrasyonu: Enzim ile gerçekleşen bir reaksiyon ortamında substrat konsantrasyonunun yeterli olduğu varsayılarak tepkime hızının enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı bilinmektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Enzim konsantrasyonu – reaksiyon hızı ilişkisi.

2. Substrat konsantrasyonu: Bir reaksiyon ortamında enzim moleküllerinin hepsinin substrat ile doymuş halde bulunduğu noktada tepkimenin hızının maksimum olduğu bilinmektedir. Bu esnada ortamdaki tüm enzimler enzim-substrat (ES) kompleksi oluşturarak hızı maksimuma çıkarır (V_{max}). Bu noktadan sonra hız substrat konsantrasyonundan etkilenmez. Reaksiyonun dengeye ulaşması enzimin bütün bölgelerinin substratla doyduğunu ifade eder ve bu noktadaki hıza maksimum hız, yani (V_{max}) denir. Enzimin substrat konsantrasyonuna karşı gösterdiği bu davranışın matematiksel analizine ise Michaelis-Menten kinetiği denir (Şekil 3.8). Hız - substrat konsantrasyon grafiği şekilde gösterildiği gibidir:



Şekil 3.8: Michaelis-Menten eğrisi.

Enzimler genellikle Michaelis-Menten kinetiği gösterir. Reaksiyon hızının (V_0) substrat konsantrasyonuna [S] karşı hiperbolik bir grafik ortaya çıkar.

Michaelis-Menten Denklemi (3.1), reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile nasıl değiştiğini gösterir:

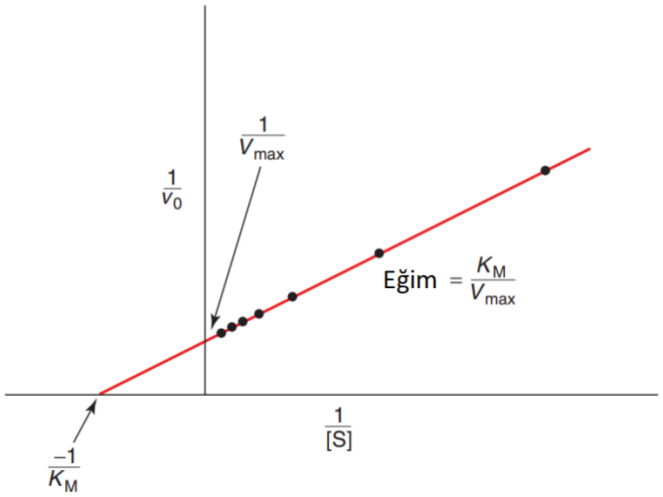
$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \qquad (3.1)$$

Reaksiyon hızının en yüksek olduğu V_{max} ın yarısındaki substrat konsantrasyonu K_M değerini verir. Bu değer enzime ve ilgili substrata spesifiktir ve o enzimin substrata olan ilgisini gösterir. K_M enzim konsantrasyonu ile değişmez ve enzimin ne kadar hızlı aktivite gösterebileceğini ifade eder. Sayısal olarak küçük K_M, enzimin substratına karşı ilgisinin yüksek olduğunu; yüksek K_M, enzimin substratına karşı olan ilginin düşük olduğunu gösterir.

Michaelis-Menten grafiğinde eğrinin üst sınırını tahmin etmek zor olduğu için yanlış yorumlanabilir. Bu yüzden veriler reaksiyon hızının üst sınırını matematiksel olarak hesaplayan Michaelis-Menten eğrisine uyan bir bilgisayar programı ile analiz edilir. Ardından bu veriler lineer olarak ifade edilebilecek bir hesaplama yöntemi olan Lineweaver–Burk grafiğine dönüştürülür. Lineweaver-Burk denklemine göre:

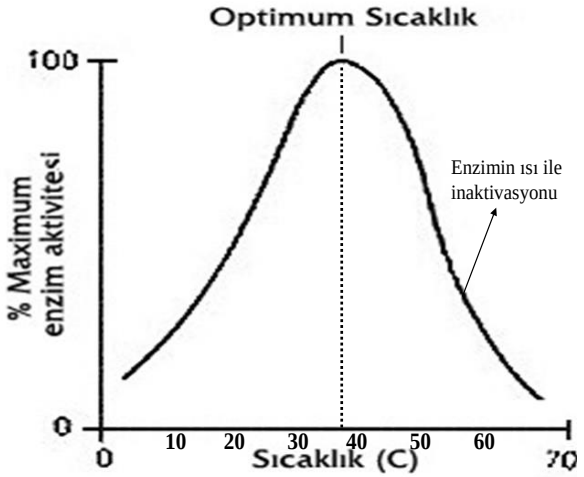
$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (3.2)$$

Substrat konsantrasyonuna [SŞ karşı enzim hızı (V_0) oranına göre çizilen bu grafikte eğimi ve kesişimleri K_M ve V_{max} değerlerini veren bir doğru elde edilir (Şekil 3.9). Çizilen noktalar şekildeki noktalara karşılık gelir.



Şekil 3.9: Lineweaver–Burk Eğrisi.

3. Isı: Reaksiyon hızı maksimum hıza ısı ile doğru orantılı olarak arttığı bilinmektedir. Isı reaksiyona giren bileşenlerin kinetik enerjilerinde artmaya ve dolayısıyla da serbest aktivasyon enerjisine kolay erişmelerine yardım eder (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Enzim aktivitesi – ısı ilişkisi.

4. pH: pH enzimin ve substratların iyonizasyon hallerinde farklılığa yol açarak veya enzimin aktif bölge yükünü değiştirerek enzim aktivitesini değişikliğe sebep olur.

Bu eşitliklere göre rekombinant üretilen NAD^+- SpIDH ve $NADP^+$-IDH1 ve $NADP^+$-R132H IDH1 enzimlerinin V_{max} ve K_M değerleri hesaplamaları Lineweaver-Burk denklemi ile yapılmıştır.

Basamak 3.2.1.9 'da gerçekleştirilen 96 saatlik inkübasyon sonrası $NADP^+$-IDH1 ve $NADP^+$-R132H IDH1 enzimlerinin bulunduğu hücre kültür süpernatanından alınan örnekler ve 3.2.2.5 de gerçekleştirilen pürifikasyon materyali ile çalışılmıştır.

Spektrofotometrik ölçümlerde Lambert-Beer yasasına göre konsantrasyon hesaplaması yapılabilir. Bu formül:

$$A = \varepsilon . d . c \tag{3.3}$$

olarak gösterilir. "A" absorbansı ifade eder ve birimi yoktur. "ε" molar absorbsiyonu katsayısı anlamına gelmektedir. Birimi $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ olan bu değer her molekül için spesifik ve sabittir. NAD(P)H molekülünün 'nin molar emiciliği 6.22 x 10^3 $L \cdot M \cdot^{-1} \cdot s^{-1}$ 'dir. "d", küvetin uzunluğudur ve santimetre cinsinden ifade edilir. Numunenin konsantrasyonu anlamına gelen "c" bileşeninin birimi $mol.L^{-1}$ dir. IDH1 enzimi aktivitesi sonucu $NAD(P)^+$'nin NAD(P)H' ye redüksiyonu gerçekleşir. NAD(P)H' nin 340 nm'de absorbansiyon göstermesi sebebiyle NAD(P)H konsantrasyonu hesaplanabilir. NAD(P)H'nin ortamdaki substrat ile ters orantılı olarak artış göstermesinden yola çıkarak enzimin hızı ve substratına ilgisini ifade eden K_M değerleri belirlenebilir [111].

Bu çalışmada, kinetik ölçümler için numuneler hazırlanırken, etkisi gözlenmek istenen bileşen (reaksiyonun substratı olan izositrat veya kofaktör NADPH) son bileşen olarak ortama eklenmiştir. 96 kuyucuklu platelere pipetlenen örnekler mikroplak okuyucuda okutulmuştur. Absorbanslar 9 dk boyunca 3 dk aralıklarla olacak şekilde 340 nm'de ölçülmüştür. Daha sonra, ΔAbsorbans / dakikanın mutlak değerleri kullanılarak kinetik okuma formülüne göre denklem 3.4 kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır:

$$V_0(IU) = \frac{{}^{\Delta A}/_{dk} \times T.V.(ml) \times 10^6}{\varepsilon \times d \times N.V.(ml)} \quad (3.4)$$

ε (ekstinsiyon katsayısı): NADPH molekülünün molar absorbsiyon katsayısı olan 6.22 x 10^3 $L \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ değeri kullanılmıştır.

d: ışık yolu olarak 1 cm kullanılmıştır.

10^6: sonucu 'mikromol /dk/L' olan sonucu U/L ye çevirme katsayısıdır .

Optimum pH ve sıcaklığın pH = 8 ve 37 ℃ olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple tampon çözeltisi olarak pH = pK_a (8.1) Tris tamponu kullanılmıştır.

$NADP^+$-bağımlı IDH enzim kinetiği çalışmaları **tablo 3.21** de özetlenmiştir.

Tablo 3.21: $NADP^+$-bağımlı IDH enzim kinetiği için farklı konsantrasyonlarda substrat ile hazırlanan reaksiyon ortamları.

Belirlenen izositrat konsantrasyonları (mM)	NADP konsantrasyonu (mM)	Tampon	Sıcaklık	Kültür mayi
1, 10, 25, 50, 100	0,5	pH = 8.1 0,1 M Tris T. (165 µl)	22 ℃	3 µl

$NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enzim kinetiği çalışmaları **tablo 3.22** de özetlenmiştir.

$$\alpha - ketoglutarat + NADPH + H^+ \rightarrow 2 - hidroksiglutarat + NADP^+$$

Bu enzim aktivitesi tayininde NADPH+H molekülünün tüketimi gerçekleşmektedir. Bu sebeple enzim kinetiği rate-down okuma yapılarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.22: $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enzim kinetiği için farklı konsantrasyonlarda substrat ile hazırlanan reaksiyon ortamları.

Belirlenen α-ketoglutarat konsantrasyonları (mM)	NADPH+H konsantrasyonu (mM)	Tampon	Sıcaklık	Kültür mayi
2, 4, 8, 16, 32, 64	1	pH = 8.1 0,1 M Tris T. (200 µl)	22 ℃	15 µl

Koenzim olarak NAD^+ kullanan rekombinant NAD^+-bağımlı IDH enziminin kinetik çalışmaları için kullanılan reaktif bileşenleri **tablo 3.23'** de gösterilmiştir.

Tablo 3.23: NAD^+-bağımlı IDH enzim kinetiği için farklı konsantrasyonlarda substrat ile hazırlanan reaksiyon ortamları.

Belirlenen izositrat konsantrasyonları (mM)	NAD^+ konsantrasyonu (mM)	Tampon	Sıcaklık	Pürifikasyon materyali
1, 10, 25, 50, 100	1	pH = 8.1 0,1 M Tris T. (250 µl)	22 ℃	3 µl

3.2.3 Metot geliştirme

I. Manuel spektrofotometrede IDH enzim aktivitesi ölçümü için en uygun dalga boyu standart çözeltiler kullanılarak belirlenmiştir.
II. Reaksiyonun optimum gerçekleştiği tampon ortamları ve pH aralıkları belirlenmiştir.
III. Reaksiyon gücü ve absorbans değerini artıran, iyonik gücü etkileyen kimyasallar çalışılmış ve farklı konsantrasyonlarda etkileri gözlemlenmiştir.
IV. İnterferense sebep olan maddelerin belirlenerek intereferenslerin ortadan kalkmasını sağlayan surfaktanlar ve bunların konsantrasyonları belirlenmiştir.
V. Rutin biyokimya laboratuvarlarında sürekli sonuç vermeye uygun fotometrik IDH ölçümü için oto-analizör üzerinde kullanılacak reaktif ve numune miktarları çalışılmıştır.
VI. Metodun serum örnekleri üzerinde optimizasyonu ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI) kılavuzlarında belirlenen standartlara uygun performans değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir.

Maksimum aktivite alınan reaksiyon ortamındaki koşullar sağlanarak serum IDH enzim aktivite ölçümüne yönelik çalışmalara başlanmıştır. Bu doğrultuda ilk olarak cam tüpe 1 ml reaktif konarak içerisine serum damlatılmış, çıplak gözle türbidite varlığı değerlendirilmiştir.

3.2.3.1 Enzimatik metodun prensibi

$NADP^+$-bağımlı izositrat dehidrogenazenzimi yazılı reaksiyonu katalizler:

$$\text{İ}zositrat + NADP^+ \rightarrow \alpha - ketoglutarat + NADPH + H + CO_2$$

Açığa çıkan NADPH+H 340 nm'de absorbans vererek enzim aktivite ölçümüne olanak tanır. Bu amaçla rekombinant üretimi gerçekleştirilen normal IDH1 enziminin aktivitesinin ölçümü gerçekleştirileceği düşünülmüştür.

$NADP^+$-bağımlı IDH1 enzimi hücrede sitozolünde aktivite gösterir. Hücre sitozolünün fizyolojik pH'sı 7.0 ila 7.4 arasında değişiklik gösterir. Fizyolojik koşulları taklit edebilmek amacıyla reaksiyon ortamı için kullanılacak tampon çözeltiler bu aralıkta hazırlanmıştır.

Metot geliştirme başlığı altındaki III. ve IV. basamakta hazırlanan tamponlar Tablo 3.24 de özetlenmiştir. Reaktifler içerisinde kullanılan bileşenleri kullanım amaçlarıyla Tablo 3.25'de gösterilmiştir.

Tablo 3.24: Enzim aktivite tayininde kullanılan tamponlar.

Kullanılan tampon	Asit bileşen	Eşlenik baz	pH aralığı	Konsantrasyon
Fosfat tamponu	Sodyum fosfat Na_2HPO_4	Sodyum dihidrojen fosfat NaH_2PO_4	6 – 8	0,1 – 0,2
Asetat tamponu	Asetik asit CH_3COOH	Sodyum asetat CH_3COONa	7 – 8	0,1 – 0,2
Tris tamponu	Tris hidroklorid $NH_2C(CH_2OH)_3.HCl$	Tris base $NH_2C(CH_2OH)_3$	7 – 8	0,05 – 0,2
Sitrat tamponu	Sitrik asit $C_6H_8O_7$	Trisodyum sitrat $C_6H_5Na_3O_7$	6 – 8	0,05 – 0,2

Tablo 3.25: Deneylerde kullanılan reaksiyon bileşenleri ve kullanım amacı.

Bileşen	Kullanım amacı
İzositrat	Reaksiyonda normal tip IDH-1 enziminin substratı
NADP β-Nikotinamid adenine dinükleotid fosfat hidrat ($NADP^+$)	Normal tip IDH-1 enziminin kofaktörü
NADPH+H	R132H mutant IDH-1 enziminin kofaktörü
Adenozin 5′-difosfat sodyum tuzu (ADP)	Enzim aktivasyonunu artırma
α-ketoglutarik asit	R132H mutant IDH-1 enziminin substratı
NaCl	Fizyolojik serum koşullarını sağlamak, iyonik gücü dengelemek
$MgSO_4$	Enzim kofaktörü
$MgCl_2$	Enzim kofaktörü
$MnCl_2$	Enzim kofaktörü
$MnSo_4$	Enzim kofaktörü
Sodyum sülfat (Na_2SO_4)	İyonik gücü dengeleyerek enzim aktivitesini artırma
Potasym klorür (KCl)	İyonik gücü dengeleyerek enzim aktivitesini artırma
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$)	Enzim kofaktörü ve iyonik gücü dengeleyerek enzim aktivitesini artırma
Proclin	Kitin stabilitesini artırma – koruyucu
Sodyum azid (NaN_3)	Kitin stabilitesini artırma – koruyucu
Potasym klorür (KCl)	İyonik gücü dengeleyerek enzim aktivitesini artırma

3.2.3.2 $NADP^+$-bağımlı normal IDH1 enzim aktivitesi ölçüm metodu geliştirme çalışmaları

$NADP^+$-bağımlı normal IDH1 enzim aktivitesi ölçümü için manuel spektrofotometre çalışmaları

İlk olarak tris tamponu içerisinde hazırlanan 0.1 M' lık NADPH+H çözeltisi ile spektrum taraması yapılmıştır. NADPH+H molekülünün 340 nm'de maksimum absorbans gösterdiği teyit edilmiştir. Numune ve reaktifler 1 cm uzunluğundaki kuvartz küvetlere pipetlenmiştir. Cihaza yerleştirilir yerleştirilmez cihazda 'auto-zero'

işlemi uygulanmıştır. Reaktif-numune karışımlarından 10 dk boyunca dakikalık absorbans değişimi takip edilmiştir. Numune olarak rekombinant üretilen $NADP^+$-bağımlı IDH enzimi için *P. pastoris* liyofilize kültür mayi kullanılmıştır.

Uygun tampon ortamının belirlenmesi

8 mM izositrat, 5 mM $CaCl_2$ ve 2 mM $NADP^+$ olacak şekilde pH=7 50 - 200 mM fosfat. asetat, tris ve sitrat tamponları hazırlanmıştır. Her bir tampon ortamında rekombinant enzimin aktivitesi değrlendirilmiştir.

Belirlenen tampon ortamının optimize edilmesi

6.5 – 8.8 arasında 50 mM ve 100 mM Tris tamponları hazırlanarak en uygun tampon ortamı belirlenmiştir.

Uygun substrat konsantrasyonunun belirlenmesi

pH 8.1 100 mM Tris tamponu içerisinde 5 mM $CaCl_2$, 2 mM $NADP^+NADP^+$-ve 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 12 ve 16 mM izositrat konsantrasyonlarında hazırlanan reaktifler ile 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır.

Uygun $NADP^+$ konsantrasyonunun belirlenmesi

100 mM pH=pK_a Tris tamponu içerisinde 10 mM izositrat, 5 mM $CaCl_2$, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, ve 8 mM konsantrasyonlarında $NADP^+$ ile hazırlanan reaktifler kullanılarak enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır

Uygun kofaktörün belirlenmesi

100 mM pH=pK_a Tris tamponu içerisinde 10 mM izositrat, 0.5 mM $NADP^+$ içerisinde $MgSO_4$, $MgCl_2$, $MnSO_4$, $MnCl_2$, $CaCl_2$ kimyasalları 5 mM konsantrasyonda ayrı ayrı hazırlanaran reaktif ile enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır.

Belirlenen kofaktör konsantrasyonunun optimize edilmesi

100 mM pH=pK_a Tris tamponu içerisinde 10 mM izositrat, 0.5 mM $NADP^+$ içerisinde farklı konsantrasyonlarda $MgSO_4$ ile hazırlanan reaktiflerle ölçüm gerçekleştirilmiştir.

İyonik gücü ve enzim aktivitesini artırmaya yönelik çalışmalar

pH = pK_a 0,1 M Tris tamponu içerisinde 8 mM $MgSO_4$, 0,5 mM $NADP^+$, 10 mM izositrat ve iyonik gücü artırarak enzimin aktivitesini artırmaya yönelik 50 mM konsantrasyonda olacak şekilde KCl, Na_2SO_4, NaCl, ADP hazırlanarak aktivite ölçümü yapılmıştır. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır.

Uygun potasyum klorür (KCl) konsantrasyonunun belirlenmesi

Bu verilere göre iyonik gücü artırmaya yönelik KCl ile çalışmalar yapılmıştır. pH = pK_a 0.1 M Tris tamponu içerisinde 8 mM $MgSO_4$; 0.5 mM $NADP^+$; 10 mM izositrat; 5, 10, 20, 40, 80, 160 mM konsantrasyonda KCl ile hazırlanan reaktifler ile aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır.

$NADP^+$-bağımlı normal IDH1 enzim aktivitesi ölçümü için oto-analizör üzerinde yapılan çalışmalar

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi rutin biyokimya laboratuvarında bulunan Abbott Architect c8000 cihazı üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılan reaktif ve numune miktarları Tablo 3.26'da belirtilmiştir. Cihazın kalibrasyonu için dH_2O kullanılmıştır.

Tablo 3.26: $NADP^+$-bağımlı normal IDH1 enzim aktivitesi için tek reaktifli oto-analizör numune-reaktif hacimleri.

Reaktif (µl)	Serum (µl)
200	8
163	6,5
164	6,3
165	5
165	3

3.2.3.3 $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enzim aktivitesi ölçümü için yapılan çalışmalar

$NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enzim aktivitesi ölçümü için manuel spektrofotometre çalışmaları

Manuel spektrofotmetre üzerinde R132H mutant IDH1 enzim aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaktifler ve kullanılan hacimleri Tablo 3.27 'de belirtiliştir. 340 nm dalga boyunda 0, 3, 6 ve 9. dk'da absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.27: Manuel spektrofotometrede çalışılan reaktif ve numune miktarları.

	Reaktif 1	Reaktif 2	Numune
	0,1 M pH 0 pK_a Tris Tamponu % 1 Gliserol 300 µM NADPH+H	0,1 M pH 0 pK_a Tris Tamponu % 1 Gliserol 140 mM α-KG	
Kullanılan hacim (µl)	300	300	60

dH_2O içerisinde hazırlanan 0,1 M α-KG çözeltisi ile spektrum taraması yapılmıştır. Bu çalışmanın ardından reaktif volümleri revize edilerek Tablo 3.28 'de belirtilen hacimlerde çözeltiler kullanılarak tekrar manuel spektrofotometre çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aktiviteyi artırmaya yönelik aplikasyon değişiklikleri ile gözlemsel deneyler yapılmıştır.

Tablo 3.28: $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH enzim aktivitesi ölçümü için II. basamak manuel spektrofotometre çalışmaları.

Deney no	Kullanılan numune	Reaktif – 1 miktarı (µl)	Reaktif – 2 miktarı (µl)	dH_2O miktarı (µl)	Numune miktarı (µl)
1.	dH_2O	500	50	60	-
2.	dH_2O % 50 gliserol içerisinde -20°C de depolanan kültür mayi	250	25	335	-
3.	% 50 PBS içerisinde -20°C de depolanan kültür mayi	250	25	275	60
4.	Liyofilize kültür mayi	250	25	275	60
5.		300	25	225	60

Tablo 3.28 (devamı): $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH enzim aktivitesi ölçümü için II. basamak manuel spektrofotometre çalışmaları.

Deney no	Kullanılan numune	Reaktif – 1 miktarı (µl)	Reaktif – 2 miktarı (µl)	dH_2O miktarı (µl)	Numune miktarı (µl)
6.	dH_2O	300	25	285	-
7.	Süpernatan kültür mayi	300	25	225	60
8.	dH_2O	400	25	225	-
9.	-20°C de depolanan kültür mayi	400	25	225	60
10.	% 50 PBS içerisinde -20°C de depolanan kültür mayi	400	25	225	60
11.	% 50 PBS içerisinde -20°C de depolanan kültür mayi	375	50	225	30
12.	Liyofilize kültür mayi	375	50	225	30
13.	Liyofilize kültür mayi, % 1 gliserol	400	10	225	60
14.	% 50 gliserol içerisinde -20°C de depolanan kültür mayi	250	25	275	30
15.	% 50 gliserol içerisinde -20°C de depolanan kültür mayi	250	25	275	60
16.	% 50 gliserol içerisinde -20°C de depolanan kültür mayi	250	25	275	100
17.	% 50 gliserol içerisinde +4°C de 1 hafta bekletilen kültür mayi	250	25	275	60

Tablo 3.28 (devamı): $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH enzim aktivitesi ölçümü için II. basamak manuel spektrofotometre çalışmaları.

Deney no	Kullanılan numune	Reaktif – 1 miktarı (µl)	Reaktif – 2 miktarı (µl)	dH_2O miktarı (µl)	Numune miktarı (µl)
18.	% 50 PBS içerisinde -20℃ de depolanan kültür mayi	250	25	275	30
19.	-20℃ de depolanan kültür mayi	250	25	275	30
20.	Liyofilize kültür mayi, % 1 gliserol	250	25	275	30

$NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enzim aktivitesi ölçümü için oto-analizör üzerinde yapılan çalışmalar

Bu amaçla hazırlanan reaktif içerikleri ve cihaz üzerinde çalışılan numune ve reaktif miktarları Tablo 3.29'da özetlenmiştir.

Tablo 3.29: $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enzim aktivitesini ölçmeye yönelik oto-analizör üzerinde kulanılan reaktifler ve kullanılan hacimler.

Deney no	Reaktif no	Bileşenler	Reaktif Miktarı (µl)	Numune miktarı (µl)
Deney-1	Reaktif-1	- 0,1 M pH 0 pK_a Tris Tamponu - % 1 Gliserol -300 µM NADPH+H	170	8
	Reaktif-2	- 0,1 M pH 0 pK_a Tris Tamponu - % 1 Gliserol 140 mM α-KG	30	
Deney-2	Reaktif-1	Deney-1 ile aynı reaktifler kullanılmıştır.	170	8
	Reaktif-2		30	
Deney-3	Reaktif-1	- 0,1 M pH 0 pK_a Tris Tamponu - % 1 Gliserol -300 µM NADPH+H	170	8
	Reaktif-2	- 0,1 M pH 0 pK_a Tris Tamponu - % 1 Gliserol	30	
Deney-4	Reaktif-1	Deney-1 ile aynı reaktifler kullanılmıştır.	170	16
	Reaktif-2		30	
Deney-5	Reaktif-1	Deney-3 ile aynı reaktifler kullanılmıştır.	170	16
	Reaktif-2		30	

Hazırlanan reaktifler oto-analizör üzerinde 340 nm dalga boyunda 7 sn'de 1 okuma olacak şekilde toplamda 30 okuma yapılarak çalışılmıştır.

3.2.3.4 Sürfaktan madde çalışmaları

Sürfaktan maddeler reaksiyon gücü ve absorbans değerini artıran, intereferenslerin ortadan kalkmasını sağlayan çözücü kimyasallardır.

pH = pK_a 0.1 M Tris tamponu içerisinde 8 mM $MgSO_4$; 0.5 mM $NADP^+$; 10 mM izositrat; 40 mM KCl olarak hazırlanan çalışma reaktifi kullanılmıştır. Reaktif içerisine bovine serum albümin, tween-20, etilen glikol, tergitol, aseton, tween-80, gliserol, etanolamin % 0,5 - 1 oranında eklenmiştir. 500 µl reaktif ve 100 µl serum örneği kuvartz spektrofotometre küveti içerisinde karıştırılmıştır. Küvet cihaza yerleştirilir yerleştirilmez sıfırlanarak dakikalık absorbans ölçümü alınmıştır. 340 nm dalga boyunda elde edilen absorbans farklarından yola çıkılarak enzim aktiviteleri üzerine etkileri ve çıplak gözle bulanıklık oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir. Manuel spektrofotometre cihazı üzerinde yapılan deneyler bir sonraki aşamada otomatik kimya analizörü üzerinde tekrar çalışılmıştır.

3.2.3.5 Yöntemin geçerli kılınması ve performans değerlendirmeleri

Analitik kimyada geliştirilen bir metodun doğrulanması o metodun kullanım alanına uygunluğunu ve aynı amaçla kullanılan diğer yöntem veya ürünler ile karşılaştırma yapılarak üstünlüklerinin belirlenmesine olanak tanır [86].

Doğruluk ve hata belirlenmesi

Doğruluk verilen ölçüm sonucunun gerçek değer ile yakınlığını ifade eder. Doğruluk hesaplamaları için önce hata hesaplaması yapılması gerekir. Bias sistematik hatadan kaynaklanan, gerçek değer ile ölçülen değer arasındaki fark olarak ifade edilir [86]. Hata metot doğrulaması yapılmış bir yöntem ile kıyaslanarak veya kalite-kontrol materyali veya sertifikalandırılmış referans madde (CRM) ile hesaplanabilir. Bu doğrultuda CRM veya metot karşılaştırması yapılabilecek alternatif bir ürün bulunmaması sebebiyle yöntemimizin doğruluk hesaplaması yapılamamıştır.

Kesinlik, aynı koşullar altında yapılan tekrarlı ölçüm sonuçlarının dağılımlarının değerlendirmesidir. Bu ölçümlerin birbiriyle uyumunu veya yakınlığını ifade eder. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsünün metot doğrulaması üzerine yayınladığı rehber doküman olan EP 15-A3 protokolüne göre farklı konsantrasyonlardaki 2 örnek ile 5,6 veya 7 gün boyunca günde 5 kez yapılan tekrarlı ölçümler sonucu elde edilen verilerle hesaplanır [112]. Kalite-kontrol materyali veya sertifikalı referans madde

gibi konsantrasyonu bilinen analitlerle yapılan ölçümlerde kesinlik ve doğruluk hesaplanması için tek bir ölçümün yeterli olduğu kabul edilmektedir. İstatistiksel analize geçmeden önce verilerin görselleştirilmesi amacıyla grafiğe aktarılması tavsiye edilmektedir. Bu aşamada aykırı değerler dışlanarak dağılımın normal aralıkta olması sağlanır [113].

Kabul edilebilir kesinlikten sapmanın (imprecision, CV_A) hesaplanması için denklem 3.5 kullanılır.

$$CV_A = (CV_E^* - 0.25)^{0,5} \quad (3.5)$$

Kesinlik değerlendirmesi

Microsoft-Excel programı kullanılarak kesinlik değerledirme hesaplamaları yapılmıştır.

Bir metodun ölçüm kesinliği, belirli ölçüm koşulları altında standart sapma, varyans veya varyasyon katsayısı (CV) gibi tutarsızlık ölçütleri ile sayısal olarak ifade edilebilir [114].

Kesinlik ölçüm-içi CV ($CV(\%)_W$), ölçümler arası CV ($CV(\%)_B$) ve laboratuvar içi CV ($CV(\%)_{WL}$) olmak üzere kendi içinde 3 bileşenden oluşur. Aşağıda yazılı denklemler 3.6, 3.7, 3.8 kullanılarak hesaplanır:

$$CV\ (\%)_W = \frac{\sqrt{MS_2}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.6)$$

$$CV(\%)_B = \frac{\left(\frac{(MS_1 - MS_2)}{n_0}\right)^{0,5}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.7)$$

$$CV(\%)_{WL} = \frac{(V_W + V_B)^{0.5}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.8)$$

n_0 : her ölçüm sonucunun ortalama değeri

$\bar{x}$: örnekteki tüm sonuçların genel ortalaması

MS_2 :Ölçüm içi değişiklik bileşeni ortalama kare değeri

MS_1 : Ölçümler arası değişiklik bileşeni ortalama kare değeri

V_w : Ölçüm içi varyans

V_B : Ölçümler arası varyans

Analitik sensitivite (LoD-LoQ-LoB)

Analit içermeyen örnek ile tekrarlı ölçümler yapılarak, ölçüm yönteminin kör numuneden ayırt edebildiği analit konsantrasyonunun hesaplanmasına LoB denir[115]. Metodun kör limitini (LoB) belirlemek için iki farklı çözelti (deiyonize su ve PBS) nin her biri 3 gün üst üste 20 kez ölçülmüş ve 3.9 denklem kullanılarak hesaplanmıştır[116]:

$$LoB = ortalama + 1.645 \times SD \quad (3.9)$$

LoD hesaplamasında LoB seviyesinin 5 katı oranında analit içeren standart çözelti düşük konsantrasyonlu örnek olarak kullanılır. 3 gün üst üste 20 tekrarlı ölçüm yapılarak denklem 3.9 kullanılarak hesaplanır:

$$LoD = LoB + c_p \times SD \quad (3.10)$$

SD, düşük konsantrasyonlu standardın ölçümlerin sonucu elde edilen verinin standart sapmasıdır. C_p düzeltme faktörüdür ve denklem 3.11 kullanılarak hesaplanır:

$$c_p = \frac{1.645}{1\frac{1}{4(L-j)}} \quad (3.11)$$

Bu denklemde yer alan L, toplam ölçüm sayısını; j düşük konsantrasyonlu numune sayısını ifade eder.

LoQ, kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır. Denklem 3.12 de gösterilen formül ile hesaplanır. Fonksiyonel sensitivite ise genellikle, yöntem CV'sinin %20 olduğu analit konsantrasyonudur [117].

$$LoQ = LoD + 10\ SD \quad (3.12)$$

Performans değerlendirmesinde dH_2O kullanılarak 3 gün üst üste 20 tekrarlı ölçümler yapılarak Standart sapma (SD), değişim katsayısı (CV) ve ortalama hesaplanmıştır.

Linearite değerlendirmeleri

Düşük ve çok yüksek aktivite ölçümü yapılan 2 farklı numune değişen oranlarda karıştırılarak orantılı olarak artan numuneler elde edilmiştir. 20 numune ile üçer defa yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar kullanılmıştır. Absorbans değerleri y-

eksenine, numune değerleri x-eksenine yerleştirilerek elde edilen grafikte linearite değerlendirmesi yapılmıştır.

İnterferans çalışmaları

Bir analitin ölçüm yapılan örnekteki konsantrasyon veya aktivitesini değiştiren maddelerin (interferan) etkileri interferans olarak tanımlanır[118]

Bir metodun geçerli kılınması sırasında hemoliz, ikter, lipemi gibi rutin biyokimya laboratuvarlarında sık karşılaşılan interferan bileşenler ile etkileşimi değerlendirilmelidir.

3.2.2.5 Stabilite çalışmaları

Hazırlanan normal ve R132H mutant IDH ölçüm kitleri reaktiflerinin her birinden 30 ml hazırlanarak +4°C ve oda sıcaklığında 3 ay bekletilmiştir. 2 hafta aralıklar ile kitler ile ölçüm yapılarak stabilite değerlendirmesi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Rekombinant Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.1.1 Genetik kodu içeren vektör sisteminin çoğaltılma ve pürifikasyon bulguları

$NADP^+$-bağımlı normal ve R132H mutant IDH1 genine ait genetik kodlarını taşıyan pSLIK-IDH1 ve pSLIK-R132H-IDH1 plazmidlerinin çoğaltılarak Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Pürifikasyon sonucu izole edilen genomik DNA'nın miktarı 260 nm'deki absorbans değeri ile saflığı (kalite) ise 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı (A260/280) ile belirlenmiştir. Konsantrasyonu 80 ng/µl, saflığı 1.53 çıkan örnek PCR ile çoğaltılacak hedef gen bölgesi için kalıp DNA olarak kullanılmıştır

4.1.2 Genetik kodun pPICZα-A taşıyıcı vektörüne aktarımı bulguları

PCR ürünleri ve taşıyıcı vektör olan pPICZα-A'nın restriksiyon enzimleriyle muamelesinin ardından Column-Pure™ PCR Clean-up Kit (Lamda Biotech, ABD) ile pürifikasyonu sonucu elde edilen solüsyonların nano-drop spektrofotometre ile değerlendirme bulguları Tablo 4.1'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1: Nano-drop ile DNA ölçüm souçları.

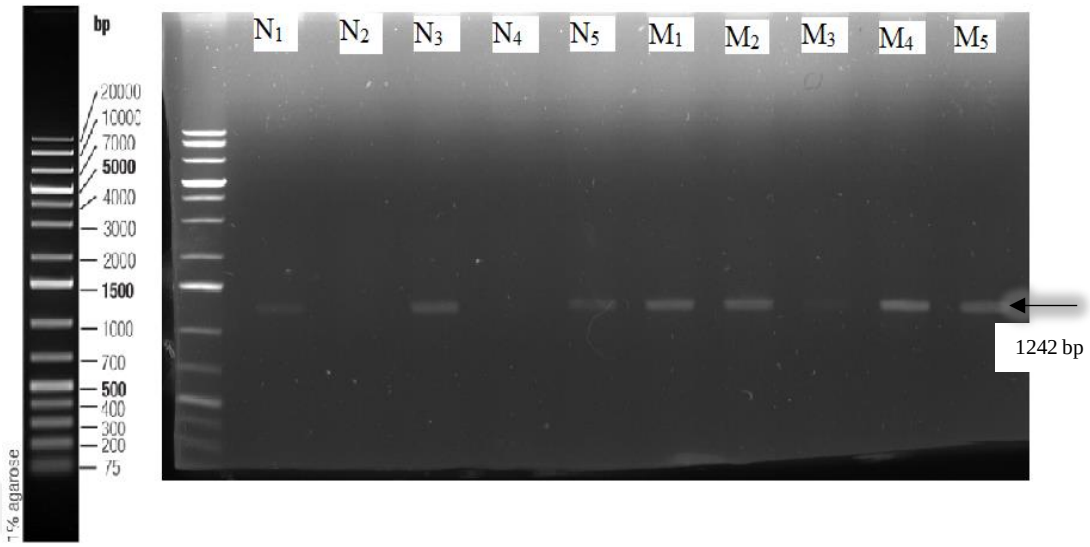
Materyal	DNA miktarı
Normal-IDH genetik materyali	30 ng/µl
R132H mutant IDH genetik materyali	24 ng/µl
pPICZα-A vektörü	54 ng/µl

Vektörün alkalen fosfataz enzimi ile muamelesini takriben yapılan 2.pürifikasyon materyali ile tekrar ölçüm alınmıştır. 15 ng/µl olarak ölçüm sonucu gözlenmiştir.

4.1.3 Ligasyon ürününün kompetan hücrelerde çoğaltılması bulguları

Zeocin'li agar plaklarda büyütülen *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerinden alınarak sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Bu aşamada 5 ayrı pPICZα-A/IDH1, 5 ayrı pPICZα-A/R132H-IDH1 kolonileri oluşturulmuştur. Ligasyon ürünlerinin DNA

miktarı ölçüm sonuçları Tablo4.2'de gösterilmiştir. mikKolonilerden yapılan agaroz jel elektroforezinin görüntüleme bulguları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



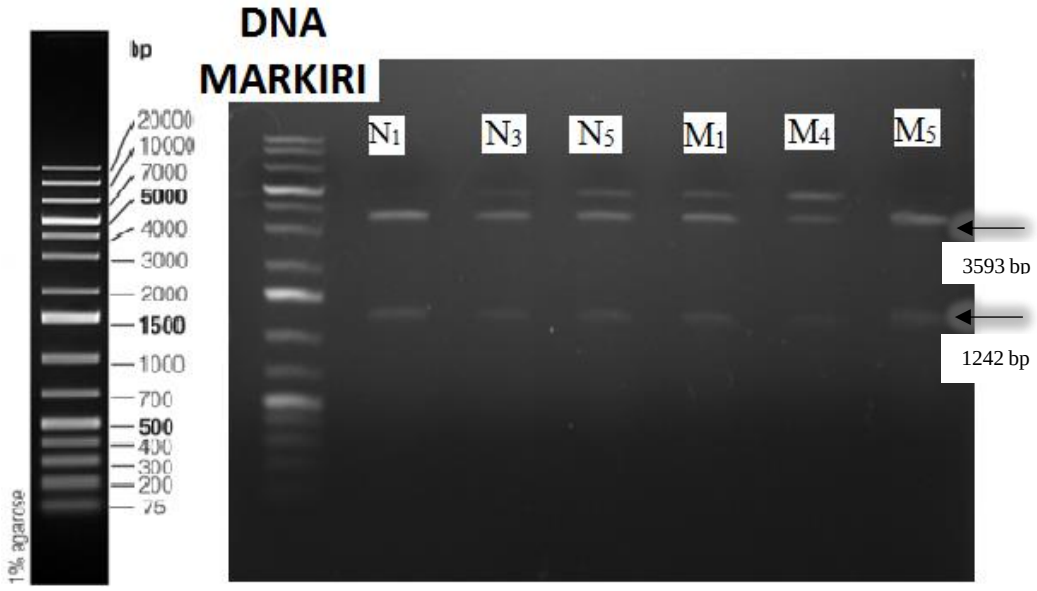
Şekil 4.1: PCR koloni görüntüleme bulguları.

Bu sonuçlara göre normal IDH1 genetik kodunu barındıran N_1, N_3, N_5 tüpleri ile R132H mutant IDH1 genetik kodunu barındıran M_1, M_2, M_4, M_5 tüpleri içerisinde pPICZα-A vektörü ile ligasyon gerçekleşmiştir.

Tablo 4.2: Ligasyon ürünlerinin nano-drop spektrofotometre okuma sonuçları.

Koloni	M_1	M_2	M_4	M_5	N_1	N_3	N_5
Ölçüm sonucu	20 ng/µl	11 ng/µl	20 ng/µl	21 ng/µl	22 ng/µl	14 ng/µl	19 ng/µl

Deney sırasında kontaminasyon riski sebebiyle koloni PCR görüntülerinin (+) sonuç verme ihtimaline karşı Column Pure Plasmid Miniprep Kit (Lamda Biotech, ABD) kullanılarak pürifiye edilen pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörleri EcoRI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelde yürütme işlemi yapılmıştır. Bu işleme ait görüntü Şekil 4.3 de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: pPICZα-A/IDH1 ve pPICZα-A/R132H-IDH1 vektörlerini alan hücrelerin doğrulanması için yapılan PCR görüntüleme bulguları.

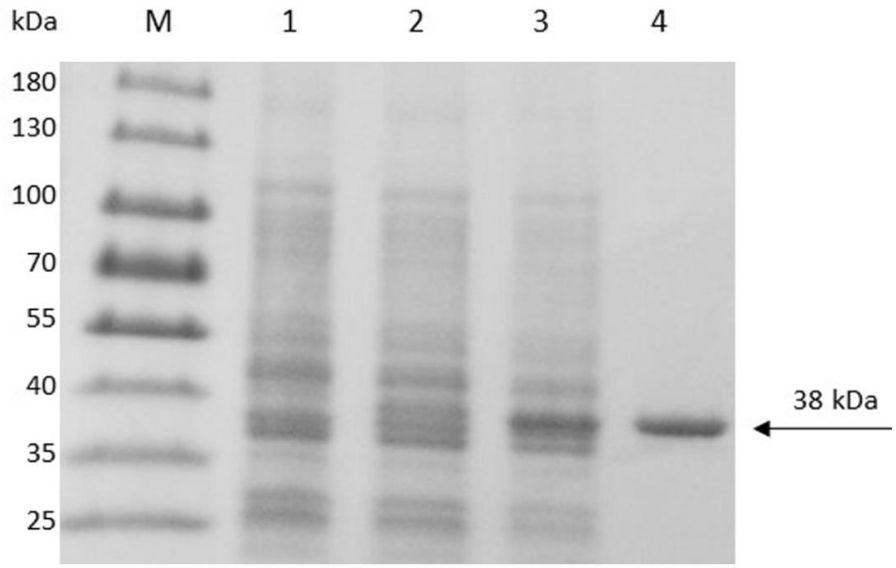
Beklenen bölgelerde bant oluşumu gözlemlenmiştir.

4.1.4 Protein miktar tayini bulguları

Abbott Architech C16000 cihazı üzerinde "Abbott Architect Urine/CSF Protein (7D79-21)" kiti kullanılarak yapılan protein miktar tayininde NAD^+-bağımlı SpIDH enzimi için pürifikasyon materyalinde 12 g/L protein tespit edilmiştir. $NADP^+$-bağımlı IDH enzimi için liyofilize kültür mayiden yapılan protein miktar tayininde ise 850 mg/L protein tespit edilmiştir.

4.1.5 SDS-PAGE analizi görüntüleme bulguları

Rekombinant NAD^+-SpIDH enzimi ile yapılan SDS-PAGE analizi Şekil 4.3 'de gösterilmiştir. M, 1, 2, 3, 4 numaralı kolonlar sırasıyla (M) markır, (1) indüksiyon yapılmamış koloni, (2) 1 saatlik IPTG indüksiyonu yapılmış koloni, (3) 3 saatlik IPTG indüksiyonu yapılmış koloni, (4) pürifikasyonu yapılmış hücre lizatları.



Şekil 4.3: Rekombinant NAD^+-SpIDH SDS-PAGE analizi.

4.1.6 Enzim kinetiği çalışmaları

4.1.6.1 Rekombinant $NADP^+$- bağımlı normal IDH enzim kinetiği

Protein ekspresyonu indüklenen *Pichia Pastoris* kültürü santrifüj edilerek üst fazı ile enzim aktivite çalışmaları yapılmıştır. Liyofilize edilen süpernatan kültür mayiden yapılan protein miktar tayininde 850 mg/L protein tespit edilmiştir.

Reaksiyon ürünlerinden olan NADPH+H molekülünün 340 nm de verdiği absorbans sebebiyle enzim aktivite ölçümleri bu dalga boyunda yapılmıştır.

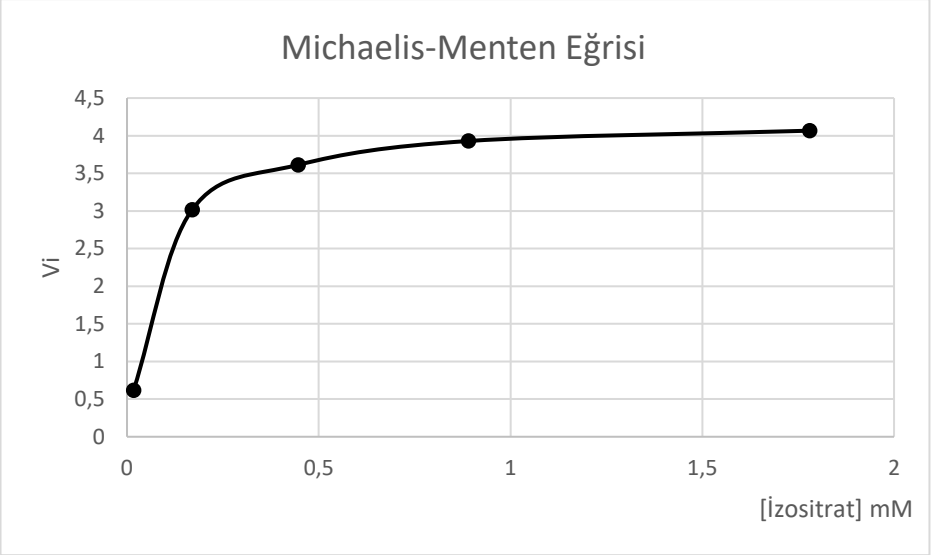
22℃, pH= 8.1 Tris tamponu içerisinde 0,5 mM $NADP^+$, 8 mM izositrat ile hazırlanan reaktifle reaktif-numune miktarını belirlemek için yapılan ön deney bulguları Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3: Reaktif-numune miktarını belirlemek için yapılan deney sonuçları.

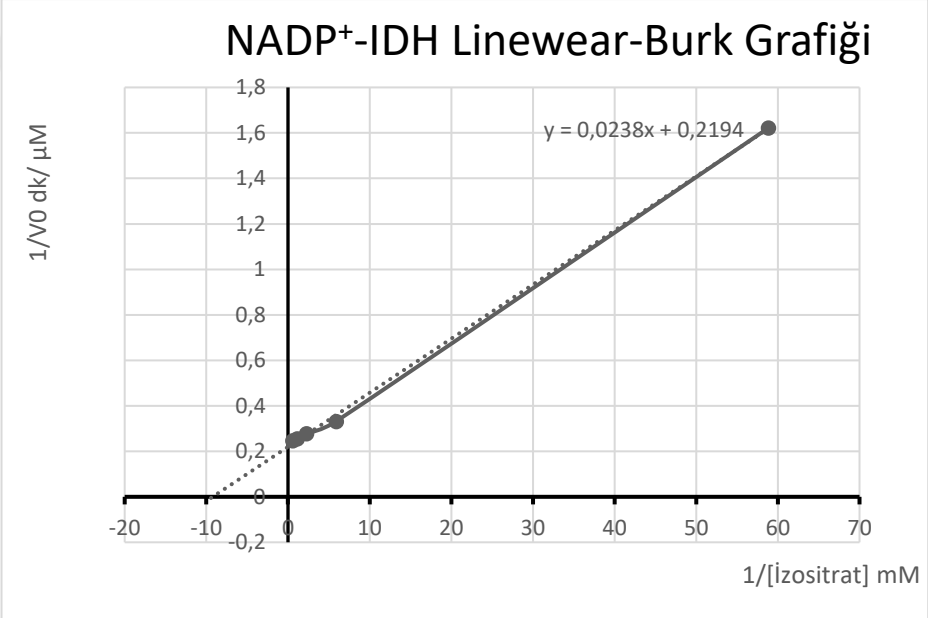
Reaktif miktarı (µl)	Kültür mayi miktarı (µl)	0.dk	3.dk	6.dk	Enzim aktv (IU)
150	5	0.124	0.127	0.132	7.4
150	15	0.167	0.175	0.18	3.53
150	50	0.24	0.36	0.49	6.62

Bu deney sonucunda numune miktarının 5 µl olmasına karar verilmiştir.

22°C, pH= 8.1 Tris tamponu içerisinde 0,5 mM $NADP^+$, farklı konsantrasyonlarda izositrat içeren reaktifler ile alınan aktivite bulguları Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Rekombinant $NADP^+$-bağımlı IDH enzimine ait Michaelis-Menten Eğrisi.



Şekil 4.5: Rekombinant $NADP^+$-bağımlı IDH enzimine ait Lineveawer Burk grafiği.

Rekombinant $NADP^+$-bağımlı normal IDH-1 enziminin kinetik özellikleri Tablo 4.4'de özetlenmiştir.

Tablo 4.4: Rekombinant $NADP^+$-bağımlı normal IDH enzim kinetiği değerleri.

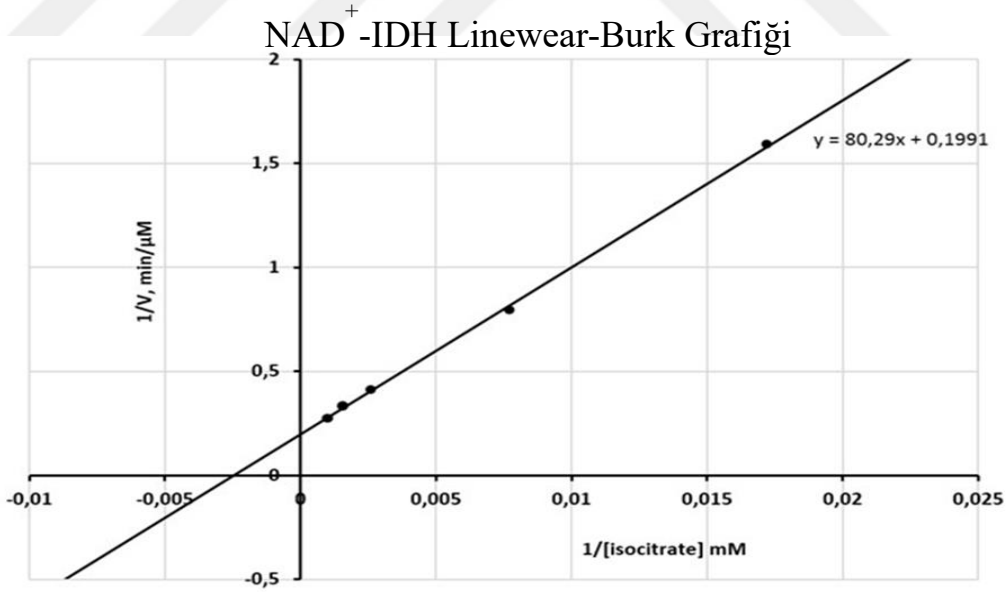
	V_{max}(µM/dk)	$K_{M(ICT)}$(µM)	Spesifik aktivite (U/gr protein)
$NADP^+$-bağımlı IDH enzimi	4.55	108	475

4.1.6.2 Rekombinant NAD^+- bağımlı IDH enzim kinetiği

Hücre lizatlarıyla yapılan His-tag afinite kromatografisi ile prüfikasyonu gerçekleştirilen materyal ile yapılan çalışmalarda 12 g/L protein, 2000 U/L enzim aktivitesi alınmıştır. Rekombinant enzimin kinetik değerlendirmeleri Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Rekombinant NAD^+-bağımlı IDH enzim kinetiği değerleri.

	V_{max}(µM/dk)	$K_{M(ICT)}$(µM)	Spesifik aktivite (U/gr protein)
NAD^+-bağımlı IDH enzimi	5.02	404	166

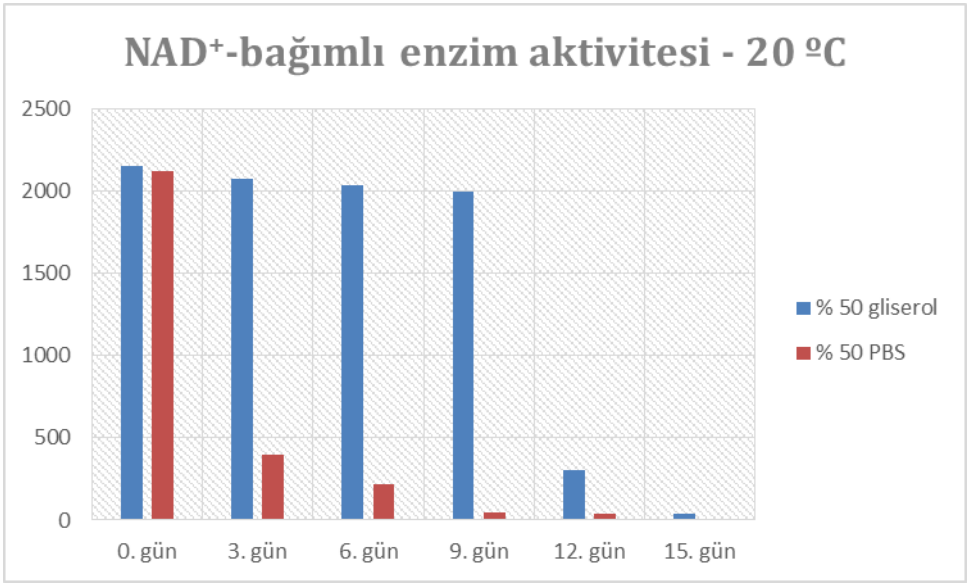


Şekil 4.6: Rekombinant NAD^+-bağımlı IDH Linewear-Burk grafiği.

4.1.7 Rekombinant üretilen enzimlerin stabilite değerlendirmeleri

4.1.7.1 NAD^+-bağımlı IDH

NAD^+-bağımlı IDH enziminin pürifikasyon materyalinden alınan örneklerle yapılan çalışma bulguları Şekil 4.7' de özetlenmiştir.

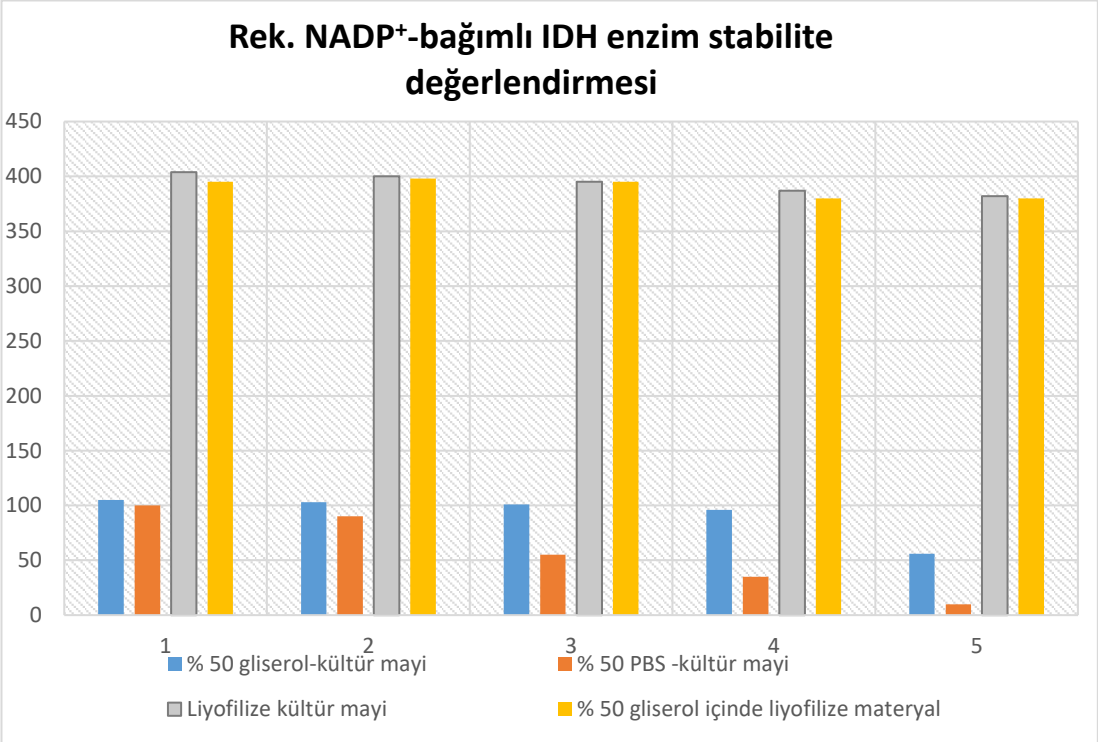


Şekil 4.7: NAD$^+$-bağımlı IDH enzimin stabilite değerlendirmeleri.

NAD$^+$-bağımlı IDH enziminin 10 gün stabil olduğu, 10 günden sonra aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir.

4.1.7.2 NADP$^+$-bağımlı IDH

NADP$^+$-bağımlı IDH enziminin stabilite değerlendirmeleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8: NADP$^+$-bağımlı IDH enzimin stabilite değerlendirmeleri.

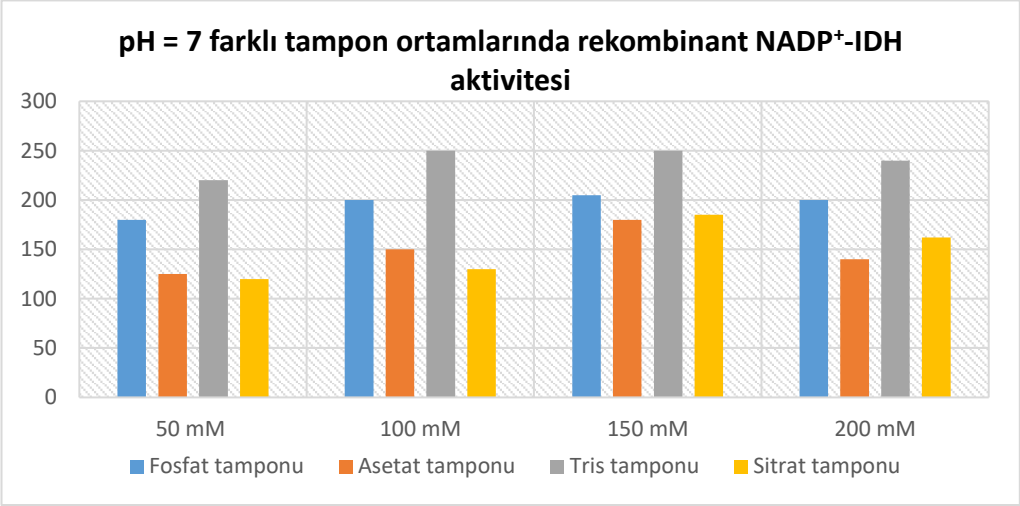
Üretilen rekombinatn $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin – 20 ºC ‘de 6 aya kadar stabilitesini koruduğu gözlenmiştir.

4.2 Metot Geliştirme Bulguları

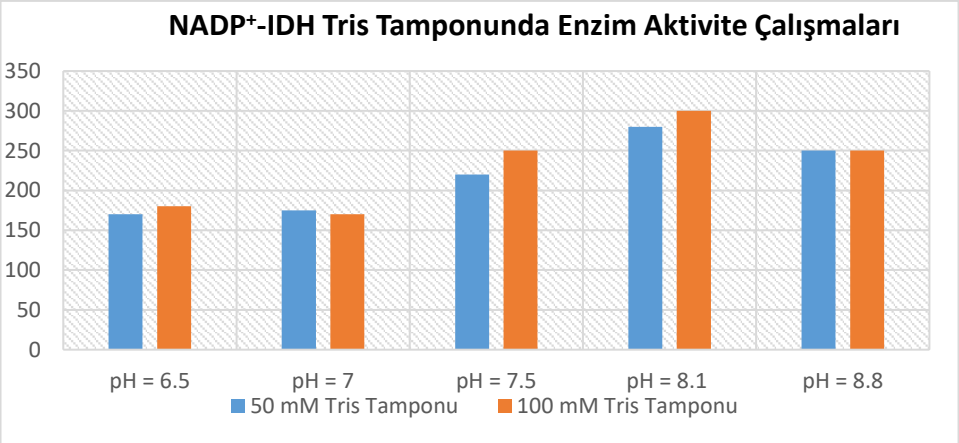
4.2.1 Manuel spektrofotometre çalışma bulguları

4.2.1.1 $NADP^+$-bağımlı normal IDH enzim aktivitesi ölçüm metodu çalışmaları bulguları

8 mM izositrat, 5 mM $CaCl_2$ ve 2 mM $NADP^+$ olacak şekilde pH=7 de farklı konsantrasyonlarda hazırlanan tampon çözeltileriyle alınan enzim aktivite bulguları Şekil 4.9’da gösterilmiştir. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile yapılan çalışmada tris tamponunun enzim aktivitesinin alınmasında en uygun tampon olacağı gözlenmiştir. Farklı pH’larda yapılan çalışma bulguları Şekil 4.10 da gösterilmiştir.



Şekil 4.9: Farklı tampon ortamlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisi.

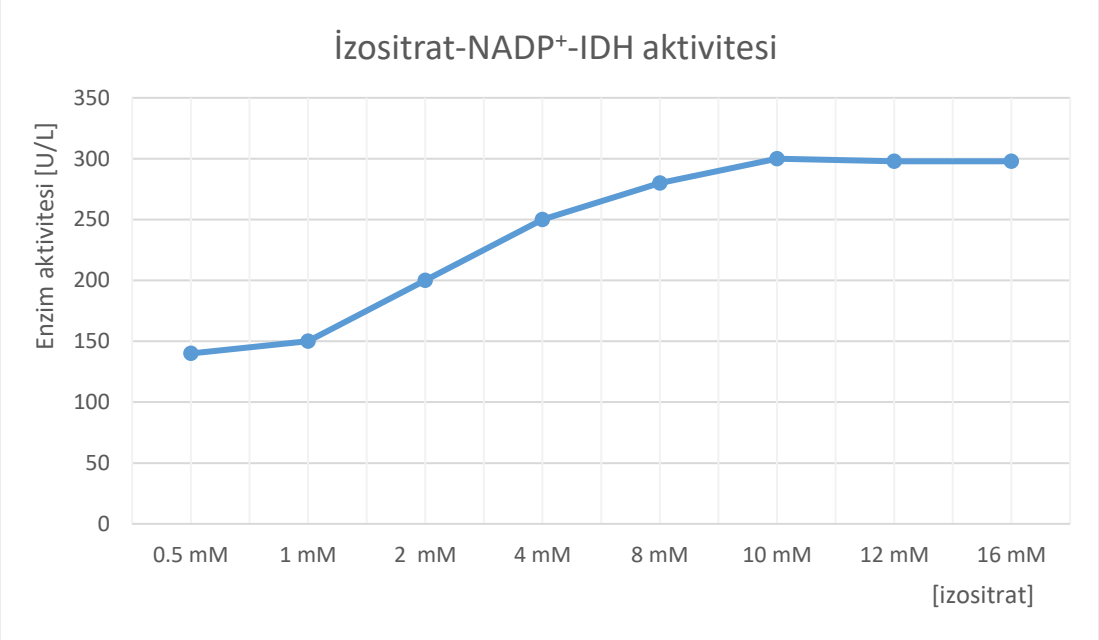


Şekil 4.10: Tris tamponunda $NADP^+$-IDH enzim aktivite çalışmaları.

Enzim aktivitesinin en iyi alındığı tampon ortamı pH = pK_a (8.1) tris tamponu olarak gözlenmiştir. Alkali ortamın enzim aktivitesinde artırdığı bulgusuna varılmıştır.

Substrat konsantrasonunun enzim aktivitesi üzerinde etkisi

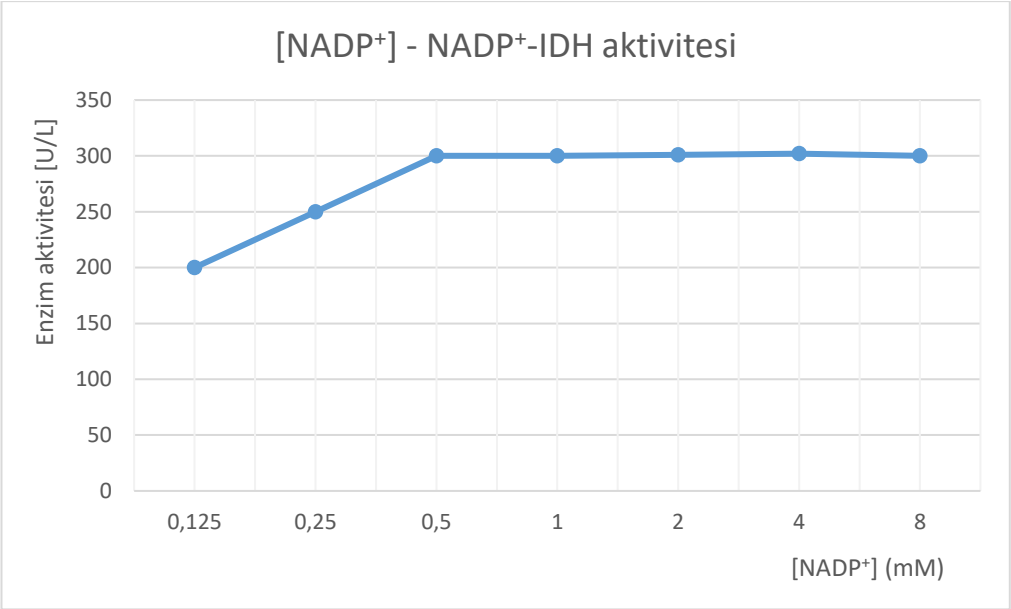
$NADP^+$-bağımlı IDH enziminin substratı olan izositrat molekülü 100 mM pH=pK_a Tris tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak ölçülen enzim aktivitesi sonuçları Şekil 4.11 'de gösterilmiştir. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır. Optimum aktivitenin 10 mM konsantrasyonda alındığı gözlenmiştir.



Şekil 4.11: İzositrat konsantrasyonunun $NADP^+$-IDH aktivitesine etkisi.

$NADP^+$ konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

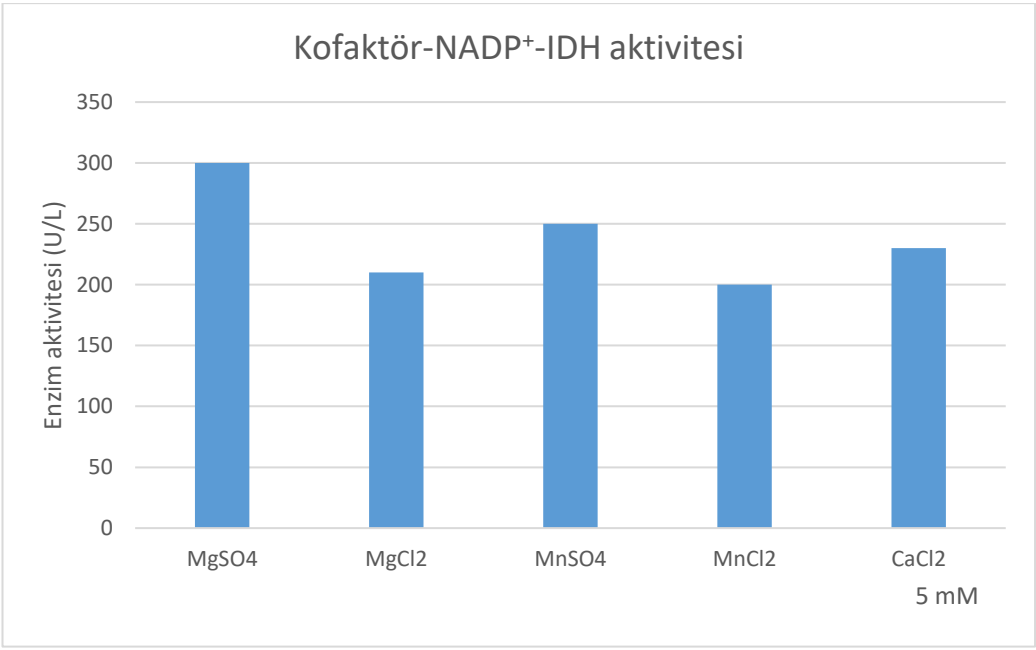
100 mM pH=pK_a Tris tamponu içerisinde 10 mM izositrat, 5 mM $CaCl_2$ ve farklı konsantrasyonlarda $NADP^+$ ile hazırlanarak ölçülen enzim aktivitesi sonuçları Şekil 4.12 'de gösterilmiştir. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır. Optimum aktivitenin 0.5 mM konsantrasyonda alındığı gözlenmiştir.



Şekil 4.12: $NADP^+$ konsantrasyonunun NADP+-IDH aktivitesine etkisi.

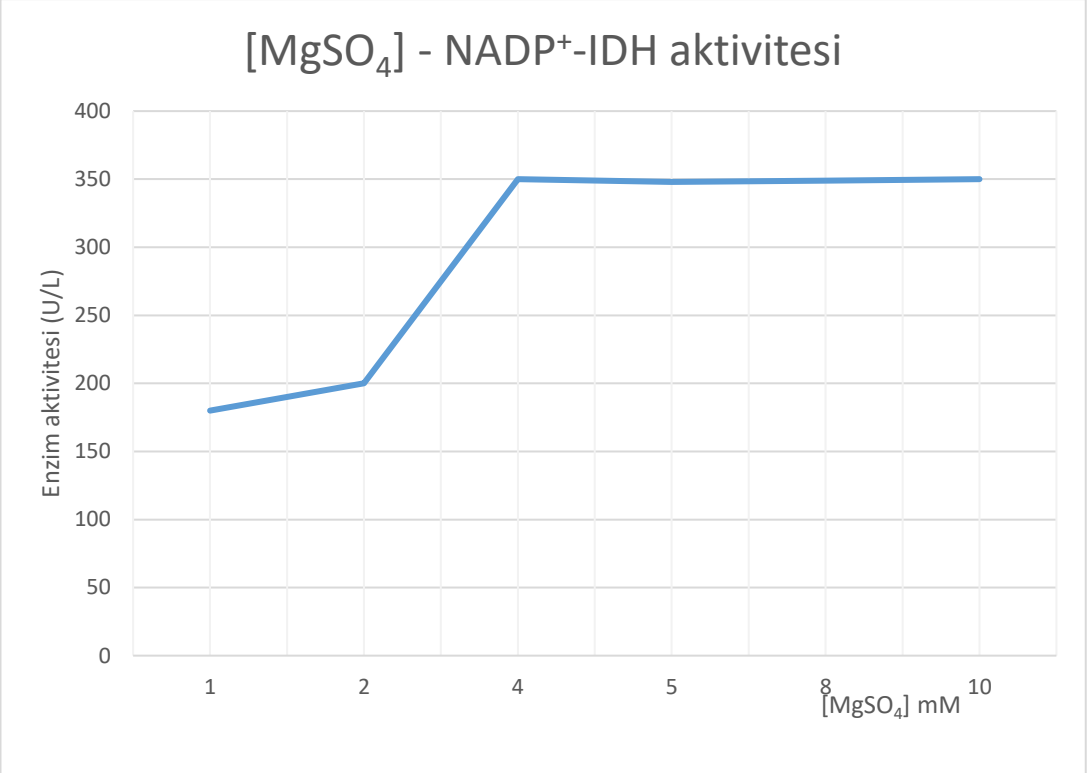
Kofaktörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

100 mM pH=pK_a Tris tamponu içerisinde 10 mM izositrat, 0.5 mM $NADP^+$ içerisinde $MgSO_4$, $MgCl_2$, $MnSO_4$, $MnCl_2$, $CaCl_2$ kimyasalları 5 mM konsantrasyonda ayrı ayrı eklenerek hazırlanan reaktif ile yapılan enzim aktivitesi ölçüm sonuçları Şekil 4.13 'de gösterilmiştir. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır. Bu bulgulara göre $MgSO_4$ ile çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.13: Farklı kofaktörlerin $NADP^+$-IDH aktivitesi üzerinde etkisi.

100 mM pH=pK_a Tris tamponu içerisinde 10 mM izositrat, 0.5 mM $NADP^+$ içerisinde farklı konsantrasyonlarda $MgSO_4$ ile hazırlanan reaktiflerle yapılan ölçüm sonuçları Şekil 4.14 'de gösterilmiştir. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır

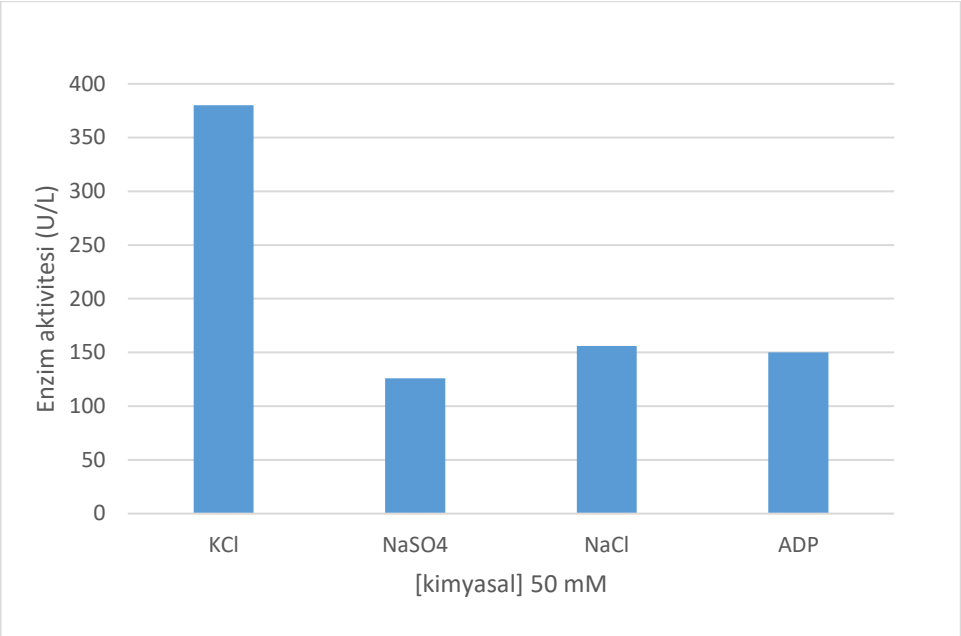


Şekil 4.14: $MgSO_4$ konsatrasyonunun NADP+-IDH aktivitesi üzerinde etkisi.

Optimum aktivitenin alındığı reaktif 100 mM pH=pK_a Tris tamponu içerisinde 10 mM izositrat, 0.5 mM $NADP^+$, 4 mM $MgSO_4$ olarak belirlenmiştir.

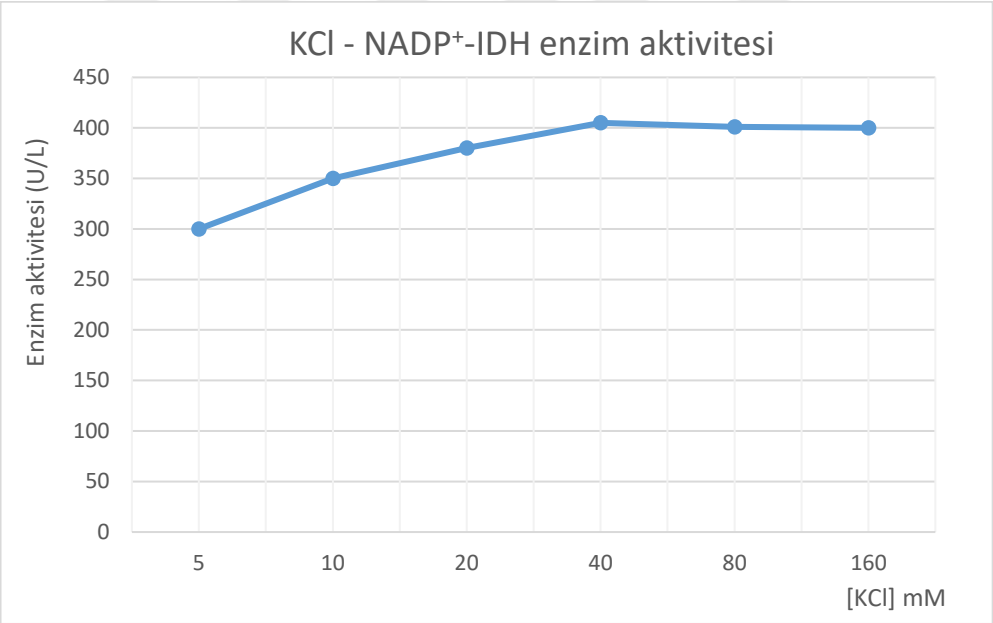
İyonik gücü artırmaya yönelik çalışma bulguları

pH = pK_a 0,1 M Tris tamponu içerisinde 8 mM $MgSO_4$, 0,5 mM $NADP^+$, 10 mM izositrat ve iyonik gücü artırarak enzimin aktivitesini artırmaya yönelik moleküller 50 mM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanarak aktivite ölçümü yapılmıştır. 800 µl reaktif, 100 µl numune miktarları ile çalışılmıştır. Şekil 4.15 'de gösterildiği üzere en iyi aktivite artışı KCl ile gözlenmiştir.



Şekil 4.15: 50 mM konsantrasyonda farklı kimyasalların aktivite ölçümüne etkisi.

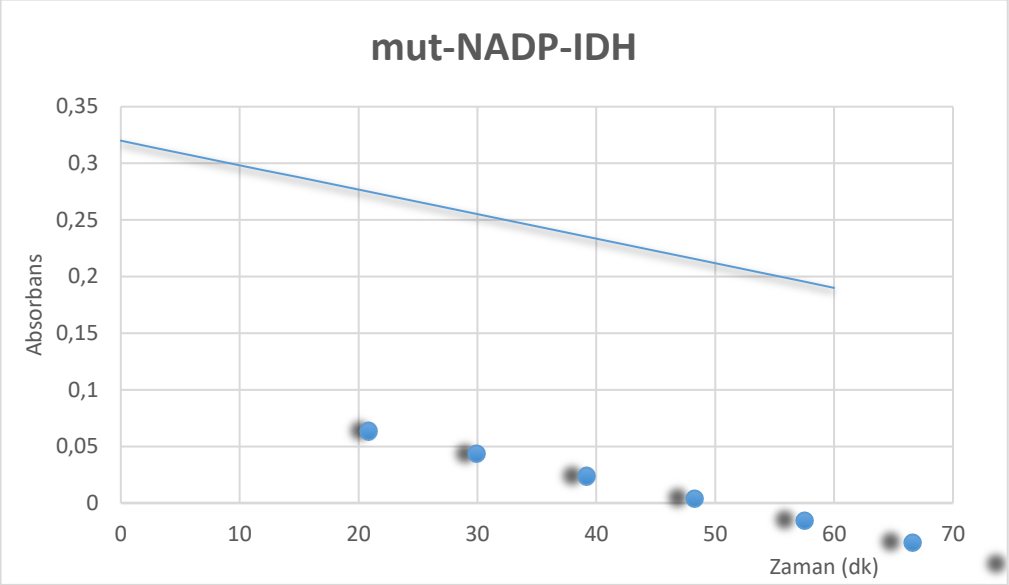
Bu verilere göre iyonik gücü artırmaya yönelik KCl ile çalışmalar yapılmıştır. 5 – 160 mM KCl ile yapılan ölçüm sonuçları Şekil 4.16 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16: [KCl] - $NADP^+$-IDH aktivitesi.

Bu çalışma neticesinde IDH enzim aktivite ölçümü için oto-analizör ile uyumlu kit geliştirmede % 1 gliserol kullanılması uygun görülmüştür.

4.2.1.2 NADP$^+$-bağımlı R132H mutant IDH aktivite ölçüm metodu çalışma bulguları



Şekil 4.17: R132H mutant IDH enzimi ile manuel spektrofotometrede çalışılan NADPH için zaman-absorbans grafiği.

Manuel spektrofotometre üzerinde yapılan Tablo 3.23' de belirtilen deneyler ile ilgili 340 nm de yapılan absorbans değişimi ölçümü sonuçları: (Şekil 4.17)

Deney no – 1: Absorbans = 1,99 olarak ölçülmüştür. α-KG molekülünün 340 nm' de absorbans verdiği gözlemlenmiştir.

Deney no – 2: ΔA/dk = 0, 91.

Deney no – 3: ΔA/dk = 0,0042

Deney no – 4: ΔA/dk = 0,004

Deney no – 5: Liyofilizasyon sonrası çökelti oluşumu gözlendiği için yoğun bulanıklık oluşumu gözlenmiştir. Ölçüm değerlendirmeye alınmamıştır.

Deney no – 6: ΔA/dk = 0,00004

Deney no – 7: ΔA/dk = 0,0015

Deney no – 8: ΔA/dk = 0,0026

Deney no – 9: ΔA/dk = 0,0022

Deney no – 10: ΔA/dk = 0,0022

Deney no – 11: ΔA/dk = 0,0017

Deney no – 12: ΔA/dk = 0,0043. Türbidite varlığı gözlenmiştir.%1 gliserol eklenerek deney-13 yapılmıştır.

Deney no – 13: ΔA/dk = 0,003

Deney no – 14: ΔA/dk = 0,004

Deney no – 15: ΔA/dk = 0,004

Deney no – 16: ΔA/dk = 0,0054

Deney no – 17: ΔA/dk = 0,0009

Deney no – 18: ΔA/dk = 0,008

Deney no – 19: ΔA/dk = 0,002

Deney no – 20: ΔA/dk = 0,001

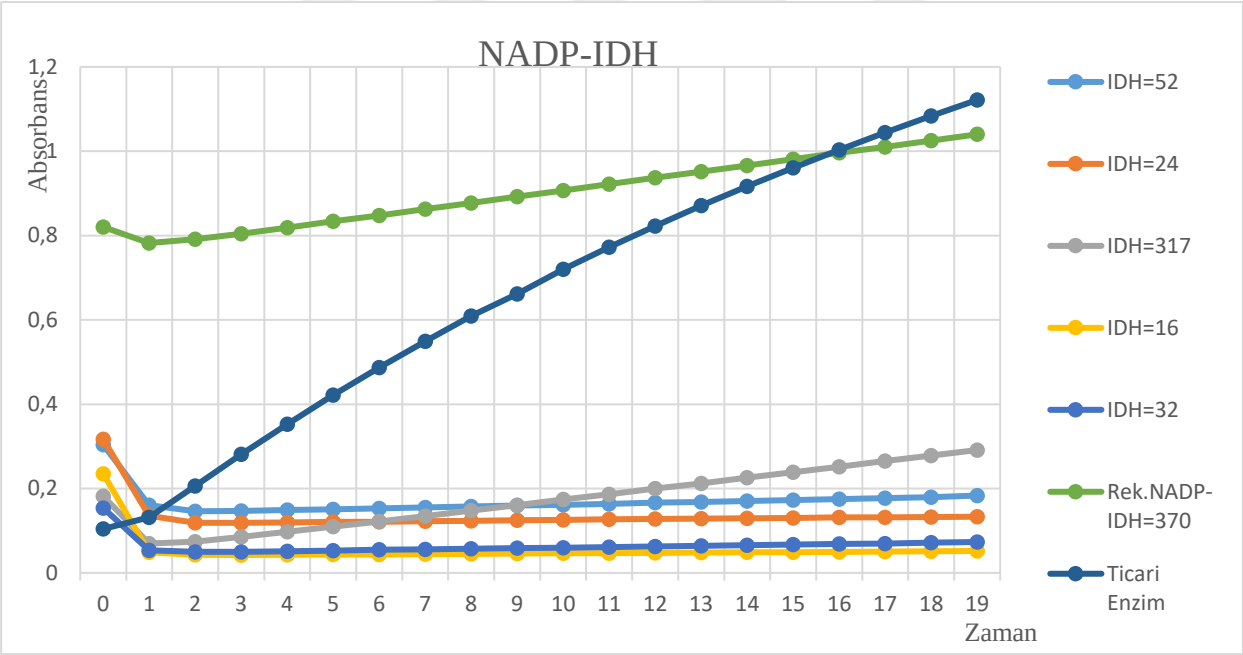
4.2.2 Otomatik kimya analizörü üzerinde çalışma bulguları

4.2.2.1 $NADP^+$-bağımlı IDH enzimi aktivite ölçüm çalışmaları

Manuel spektrofotometre üzerinde optimize edilen $NADP^+$-bağımlı IDH enzimi aktivite ölçümü kiti için Abbott Architect C8000 otomatik kimya analizörü üzerinde rekombinant $NADP^+$-IDH ve hasta serumları ile çalışmalar yapılmıştır.

4.2.2.2 Hasta ve sağlıklı insan serumları üzerinde çalışma bulguları

$NADP^+$-bağımlı normal IDH enzimi aktivitesinin karaciğer hücre harabiyeti sonucu dolaşıma salınması ile serumda miktarının arttığı bilgisi literatürde yer almaktadır. Klinikte karaciğer doku harabiyetiyle korele olarak artış gösteren serum ALT enziminin aktivitesi değerlendirilmektedir. Bundan yola çıkılarak $NADP^+$-bağımlı normal IDH enzimi aktivitesi ölçüm çalışmamız için ilgili etik kurul makamlarından onayı alınarak ALT aktiviteleri artmış hasta serumları kullanılmıştır. Serumda artmış ALT aktivite olan numuneler ile yapılan çalışma bulguları Şekil 4.18 ve Tablo 4.6 ‘da özetlenmiştir.



Şekil 4.18: Oto-analizör üzerinde serum ve $NADP^+$-bağımlı enzimlerin okuma grafikleri

Tablo 4.6: Yüksek ALT aktivitesine sahip hasta serumları ile $NADP^+$-bağımlı IDH aktivitesi karşılaştırması.

ALT (IU/L)	IDH(IU/L)
5100	418
1205	134
2548	1763
376	546
876	53
289	35
1312	29
692	412
412	70
Rek-$NADP^+$-IDH	370
Ticari enzim	2000

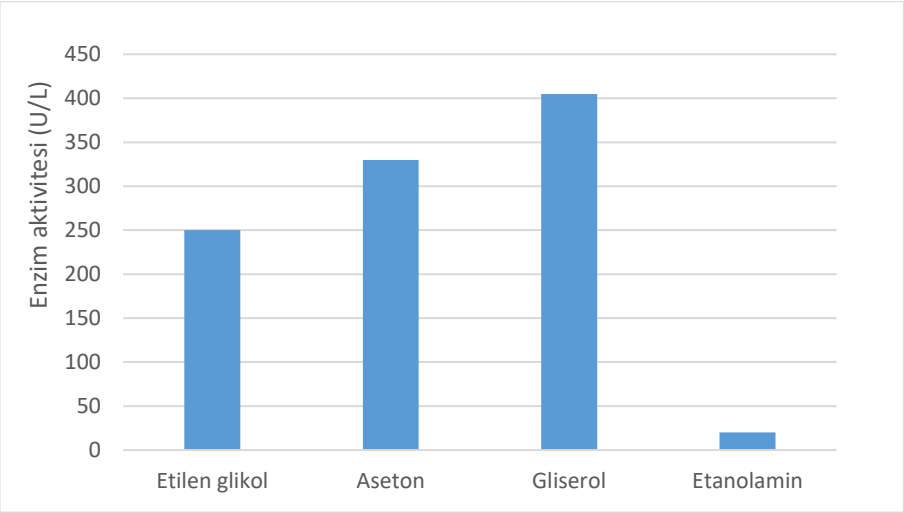
4.2.2.3 Sürfaktan madde çalışma bulguları

Serumun reaktif içerisinde çözünürlüğünü artırmaya yönelik sürfaktan madde eklenmiştir. 0,1 M pH=pKa tris tamponu içerisinde 0,5 mM $NADP^+$, 4mM MgSO4, 10 mM izositrat, 40 mM KCl olarak hazırlanan çalışma reaktifi kullanılmıştır. Önce cam tüp içerisinde sürfaktan madde eklenerek çıplak gözle bulanıklık oluşturup oluşturmadığı gözlenmiştir. Uygun görülen sürfaktanlar ile hazırlaran reaktifler 500 µl reaktif ve 100 µl serum örneği olacak şekilde cihaz üzerinde ayarlanmıştır. Çalışma bulguları Tablo 4.7 ve Şekil 4.19 'da belirtilmiştir.

Tablo 4.7: Çalışılan sürfaktanlar ve elde edilen bulgular.

Sürfaktan madde	Çalışılan konsantrasyon	Bulanıklık	Açıklama
Bovine Serum Albumin	% 0,5 – 1 (v/v)	-	Çözünürlüğü bozarak aktiviteyi düşürdüğü gözlenmiştir.
Tween-20	% 0,5 – 1 (v/v)	+	Bulanıklık oluşturduğu için spektrofotometrik olarak değerlendirilmemiştir.
Etilen glikol	% 0,5 – 1 (v/v)	-	Aktiviteyi düşürdüğü gözlenmiştir.
Tergitol	% 0,5 – 1 (v/v)	+	Tris tamponu ile çalışılmaya uygun olmadığı gözlenmiştir.
Aseton	% 0,5 – 2 (v/v)	-	Çözünürlüğe katkısının olmadığı gözlenmiştir.
Tween-80	% 0,5 – 1 (v/v)	+	Bulanıklık oluşturduğu için spektrofotometrik olarak değerlendirilmemiştir.
Gliserol	% 0,5 – 1 (v/v)	-	Çözünürlüğü hafif artırdığı gözlemlenmiştir.
Etanolamin	% 0,5 – 1 (v/v)	-	Reaksiyon ortamının pH'sını bozarak enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir.

Bulanıklık oluşturduğu gözlenen sürfaktan maddeler ile ölçüm yapılmamıştır.



Şekil 4.19: Farklı sürfaktan maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Bu sonuçlara göre reaktif içerisine gliserol eklenmesi uygun görülmüştür. Hacimce farklı yüzdelerde gliserol ile hazırlanan reaktiflerle yapılan deney sonuçları Şekil 4.20 'de gösterilmiştir.

Şekil 4.20: Farklı konsantrasyonlarda gliserolün $NADP^+$-IDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Bu sonuçlara göre reaktif içerisine v/v olarak %1 gliserol eklenmesi uygun görülmüştür.

4.2.2.4 $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH aktivite ölçümü için yapılan çalışma bulguları

Manuel spektrofotometrede rekombinant numunelerle yapılan çalışmalar ile elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak otomatik kimya analizöründe çalışmalar yapılmıştır. Hücre kültür mayisinin liyofilizasyona tabi tutularak 1-10 oranında suyunun uçurulması sonucu elde edilen liyofilize materyal kullanılmıştır.

$NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH enzimi ölçümünün oto-analizör üzerinde aplikasyona uygun olmadığı görülmüştür. Bu aşamadan anlamlı sonuç elde edilememiştir.

4.2.3 Geliştirilen $NADP^+$-bağımlı IDH aktivite ölçüm kitinin stabilite değerlendirmesi

Optimize edilen $NADP^+$-bağımlı normal IDH aktivitesi ölçüm kitinin +4 ºC 'de stabilitesinin 30 gün olduğu gözlenmiştir. Bu süre sonunda reaktif içerisinde bulanıklık oluştuğu görülmüştür. Koruyucu olarak eklenen kimyasallar Tablo 4.8 'de belirtilmiştir.

Tablo 4.8: $NADP^+$-bağımlı normal IDH aktivitesi ölçüm kitine koruyucu olarak eklenen kimyasallar.

Bileşen	Konsantrasyon
Sodyum azid (NaN_3)	% 0,5 – 1
Proclin	% 0,5 – 1

4.2.4 Metotun geçerli kılınması

Çalışılan R132H mutant IDH ölçüm kiti otomatik kimya analizörü üzerinde çalışmaya uygun hale getirilemediği için performans değerlendirmeleri yapılamamıştır. Normal IDH1 enziminin aktivite ölçüm kiti ile yapılan validasyon çalışma sonuçları aşağıda verilmiştir.

4.2.4.1 Kesinlik değerlendirmesi

Kesinlik, aynı koşullar altında yapılan tekrarlı ölçüm sonuçlarının dağılımlarının değerlendirmesidir. Bu ölçümlerin birbiriyle uyumunu veya yakınlığını ifade eder. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsünün metot doğrulaması üzerine yayınladığı rehber doküman olan EP 15-A3 protokolüne göre farklı konsantrasyonlardaki 2 örnek ile 5 gün süresince günde 5 tekrarlı yapılan ölçümler sonucu elde edilen verilerle hesaplanmıştır.

Seçilen iki farklı numune (IDH-düşük; IDH-yüksek) ile yapılan çalışmada ölçüm içi CV (CV_w) analizleri Tablo 4.9,Tablo 4.10 ve Tablo 4.11 de belirtilmiştir.

Tablo 4.9: Kesinlik hesaplamaları.

Gün	1		2		3		4		5	
Ölçüm 1 (IU)	33	529	34	529	30	520	30	530	30	526
Ölçüm 2 (IU)	34	527	32	526	34	523	34	527	35	531
Ölçüm 3 (IU)	34	531	30	528	32	525	35	521	34	518
Ölçüm 4 (IU)	34	523	33	525	33	530	32	519	36	516
Ölçüm 5 (IU)	32	525	33	524	35	526	33	527	32	520
Ortalama	33,4	527	32,4	526,4	32,8	524,8	32,8	524,8	33,4	522,2
SS	0,894427	3,162278	1,516575	2,073644	1,923538	3,701351	1,923538	4,604346	2,408319	6,180615
CV	1,000287	1,000014	1,000876	1,000006	1,001375	1,003055	1,001375	1,000031	1,002078	1,000056

Tablo 4.10: Düşük seviye serum örneğiyle yapılan kesinlik değerlendirmesi istatistik sonuçları.

N	25	
Gün	5	
n_0	5	
Aralık	30 – 35 U	
Kesinlik hesaplamaları		
	Ölçüm içi	Ölçümler arası
Varyans	3,26	1.187
Standart Sapma	1,73328	0,4335
% CV	1,001198	0,16

Tablo 4.11: Yüksek seviye serum örneğiyle yapılan kesinlik değerlendirmesi istatistik sonuçları.

N	25	
Gün	5	
n_0	5	
Aralık	519 - 531 U	
Kesinlik hesaplamaları		
	Ölçüm içi	Ölçümler arası
Varyans	15,5	3,468
Standart Sapma	3,944	1,862
% CV	1,000632	0,3

4.2.4.2 Analitik sensitivite (LoB) hesaplama bulguları

Metodun analitik sensitivite değerlendirmesi için yapılan ölçüm sonuçları Tablo 4.12 ‘de belirtilmiştir.

Tablo 4.12: LoB değerlendirme bulguları.

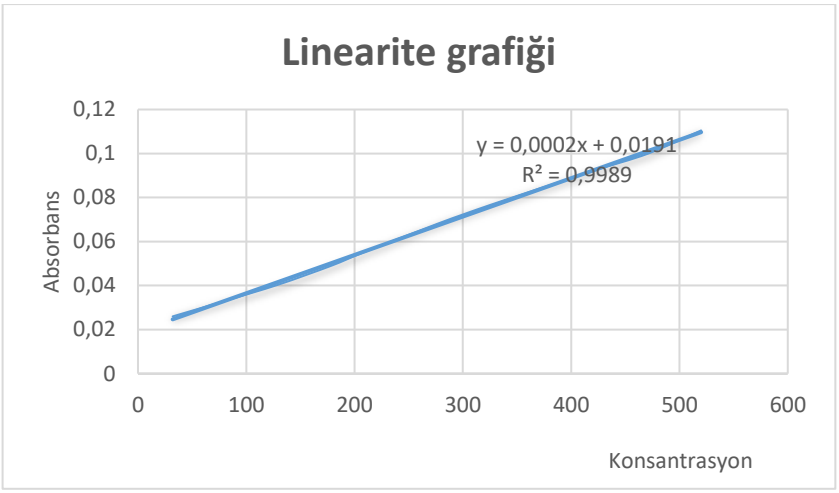
Gün	1	2	3
Ölçüm (IU/ml)			
1	0	0	1
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	1	1
5	0	0	0
6	1	0	0
7	0	1	0
8	0	0	0
9	0	0	1
10	1	1	1
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	1	1	1
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	1	0
20	1	0	0
Ortalama		0,222222	
Standart Sapma		0,425081823	

- LoB değeri denklem 3.9 a göre hesaplanmıştır.

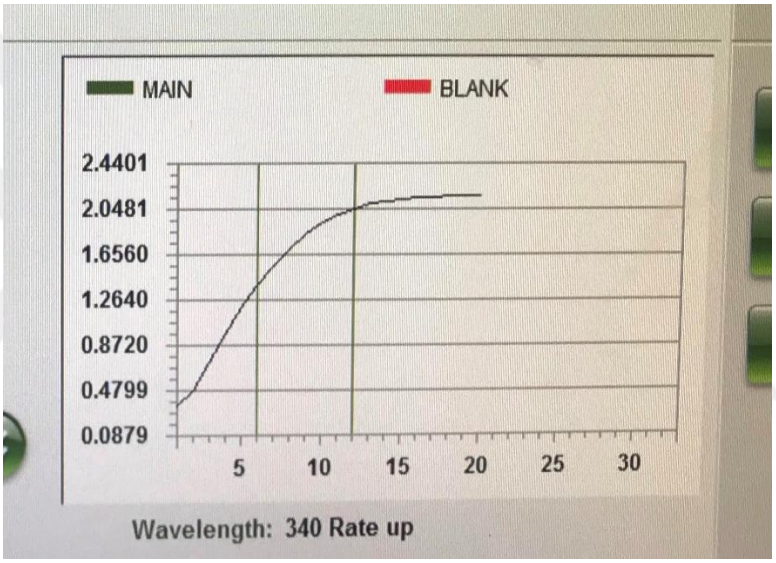
$$Ortalama_{kör} + 1.645(SS_{kör}) = 0{,}921$$

4.2.4.3 Linearite değerlendirmeleri

Linearite değerlendirmeleri için yapılan ölçümlerde metodun 0-1200 IU/ml arasında lineer olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.21). Bu değerin üstündeki numuneler için linearitenin bozulduğu (Şekil 4.22) görülmüştür. Dilüsyon önerilmektedir.



Şekil 4.21: Normal NADP-bağımlı IDH ölçüm kiti linearite grafiği.



Şekil 4.22: IDH = 2625 olarak ölçülen numune absorbans grafiği.

İnterferans çalışmaları

Hemolizli, lipemik ve hiperbilirübinemik serum örneklerinden yapılan IDH enzimi aktivite ölçümü sonuçlarına göre ölçümün bu interferans bileşenlerinden etkilenmediği reaksiyon grafikleriyle gösterilmiştir.

Stabilite çalışmaları

% 1 proclin, %1 sodyum azit ve koruyucusuz olarak hazırlanan reaktifler çalışma sonuçları Tablo 4.13'de özetlenmiştir.

Tablo 4.13: $NADP^+$-bağımlı normal IDH-1 aktivite ölçüm kitinin stabilite çalışma bulguları.

Reakif içeriği	1.gün (IU/ml)	15. gün (IU/ml)	30. gün (IU/ml)	45. gün (IU/ml)	60. gün (IU/ml)	75. gün (IU/ml)	90. gün (IU/ml)
Koruyucusuz – oda sıcaklığı	35	33	Bulanıklık (+)	-	-	-	-
Koruyucusuz - +4°C	35	35	Bulanıklık (+)	-	-	-	-
% 1 Proclin +4°C	38	34	33	35	34	Bulanıklık (+)	
% 1 Proclin oda sıcaklığı		35	30	30	Bulanıklık (+)		
% 1 sodyum azid +4°C	35	34	35	33	34	34	35
% 1 sodyum azid oda sıcaklığı		33	32	27	Bulanıklık (+)	-	-

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile metabolizmada hücresel güç kaynağı olarak görev yapan mitokondrinin daha kompleks işlevlerinin de olduğu gözlenmiştir. Programlı hücre ölümü (apoptosiz) ve kontrolsüz hücre büyümesinin düzenlenmesi gibi kanser gelişiminde rol alan bu mekanizmaların herhangi bir basamağında gerçekleşecek bir aksamanın malinite gelişimiyle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir[119]. Bu amaçla mitokondriyi hedef alan tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir.

Mitokondride bulunan, enerji metabolizmasının kalbi olarak kabul edilen tri karboksilik asit (TCA) döngüsü oksidatif dekarboksilasyonun gerçekleştiği yerdir. Glukoz, yağ asidi ve aminoasit gibi primer biyomoleküller bu siklüs aracılığı ile enerji kaynağı olarak kullanılırlar. 1956 yılında Warburg 'un kanserli hücrelerin enerji metabolizmasında normal hücrelere kıyasla büyük farklılıklar olduğunu göstermesi ile kanser gelişiminde mitokondri ve içerisinde gerçekleşen metabolik olaylar mercek altına alınmıştır. Warburg etkisine göre glikoz, mitokondri içerisinde gerçekleşen aerobik glikoliz sürecinden kaçarak sitozolde anaerobik glikolize uğrama eğilimindedir[120]. Moleküler düzeyde çalışmalar ile enerji metabolizması (TCA döngüsü) içerisindeki her hangi bir basamakta gerçekleşen genetik ve epigenetik değişikliklerin beklenmedik enzimatik reaksiyonlara ve metabolitlerin anormal birikimine, yani onkometabolitlere neden olduğu gösterilmiştir [121, 122]. Bu moleküllerin de epigenetik mekanizmalar aracılığı ile hücre farklılaşması ve proliferasyonunu değiştirdiği gözlenmiştir. TCA siklüsünde yer alan enzimlerden izositrat dehidrogenazın glioma başta olmak üzere AML, kolanjiokarsinoma, MDS gibi kanserler yakından ilişkili olduğu bilinmektedir [4, 32, 123]. Yine TCA enzimlerinden süksinat dehidrogenazın paraganlioma ve feokromasitoma, renal hücreli karsinoma, akut T hücreli lenfoma ile birliktelik gösterdiği bulunmuştur [124-127]. Bir başka TCA enzimi olan fumarat hidrataz enziminin multipıl kutanöz ve uterin liyomiyoma ve herediter liyomiyoma, renal hücreli kanser, Leydig hücreli tümör, overian sistoadenoma, serebral kavernom ve meme kanseri hastalarında mutasyonuna sık rastlanmıştır [128-130]. Bu bilgiler ışığında TCA siklüsünün her bir

basamağındaki enzimin aktivitesindeki değişikliklerin tayin edilebilmesi kanserin erken fazında tespit edilebilmesini mümkün kılacağını düşündürtmüştür. Bu amaçla ilk olarak TCA enzimlerinden biri olan izositrat dehidrogenaz ın NAD^+-bağımlı çeşidi olan IDH3 enziminin aktivite tayin metodu ile ilgili çalışmalara başlanmıştır. NAD^+-bağımlı IDH enziminin rekombinant üretim aşamaları başarıyla tamamlanarak enzimin aktivitesi ve davranışı hakkında bilgi edinilmesine yardım etmiştir. Farklı tampon ortamlarında, çok sayıda yardımcı ajan ile yapılan deneyler neticesinde insan serumlarından NAD^+-bağımlı enzim için istenen aktivite alınamamıştır. Uzun soluklu denemeler sonucu enzimin mitokondriyel bir enzim olması ve dolaşıma katılma ihtimalinin çok düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmaların 2. basamağı olarak $NADP^+$- bağımlı enzim aktivite ölçüm metodu geliştirilmiştir. Uzun yıllar önce karaciğer parankim dokusunun en hassas göstergesi olduğu belirtilen $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin aktivitesini değerlendirme amacıyla hâlihazırda kullanılan oto-analizör ile uyumlu bir yöntem bulunmamaktadır [3]. Geliştirilen $NADP^+$-bağımlı IDH enzim aktivitesi ölçüm kitinin değerlendirilen performans kriterleri ile oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre 2 nin altında % CV değeri, LoB 0.921 U/L olarak tespit edilmiştir. Reaksiyon grafiğinin 0 – 1200 U/L arasında lineer olduğu gözlenmiştir. Bu ölçüm kitinin dünya genelinde tüm rutin biyokimya laboratuvarlarında kullanılan oto-analizörler ile uyumlu olması çok geniş bir pazar payına sahip olduğu anlamına gelmektedir. Üretiminin ülkemizde gerçekleştiği, pratik, hızlı ve doğru sonuç verilmesini sağlayan bu ürün ile yerli ve milli üretime destek olarak toplum yararına; yeni hastalıklar, tedavi yöntemleri ve kilinik durumlarla ilişkileri araştırılarak bilim ve insanlık adına katma değer katan bir sonuca ulaşılmıştır.

Farklı laboratuvarlarda denenmemesi, eksternal kalite kontrol materyali temin edilmesinin zorluğu çalışmanın kısıtlılıkları arasında yer almaktadır.

Çalışmanın 3. ve en zor basamağında ise mutant enzim ile ilgili aktivite ölçümü ve rekombinant üretimi yapılmıştır. Enzimin rekombinant üretimi aşamasında *Pichia pastoris* mikroorganizması ile çalışılmasının verdiği pratiklik sonucu büyük bir zorlukla karşılaşılmamıştır. Maya hücrelerinin genetik kodu arasına ilgili proteine ait genetik kodun yerleştiğine dair kontrol PCR aşamasının başarısız olması sonucu hücre duvarını parçalama işlemi yapılarak oluşan süpernatan ile PCR tekrarlanmıştır. İstenen genetik kodun konak DNA sına yerleştiği tespit edilerek deneyin tekrarında hücre duvarı ‘lysis’ işlemine bırakılmıştır. His-tag kodonuna sahip pPICZα vektörü ile

Pichia pastoris maya hücrelerine sentezlettirilen $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin his-tag afinitesi ile nikel bağımlı kolondan geçirilerek pürifikasyona tabi tutulma işlemi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu sonucun proteinin tersiyer katlanma özelliklerinden his-tag kodonunu barındıran N' terminal ucun proteinin iç bölgelerinde kalması sebebiyle gerçekleştiği düşünülmüştür. Kültür süpernatanından eksprese edilen proteinin pürifikasyon işleminin yapılamamış olması, protein miktar tayinini çalışmamız için anlamsız kılmaktadır. Bu sebeple rekombinant olarak üretilen normal ve R132H mutant $NADP^+$-bağımlı IDH enzimlerinin, bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısı olarak ifade edilen ve kısaca 'k_{cat}' olarak gösterilen turnover sayısı belirlenememiştir.

$NADP^+$-bağımlı izositrat dehidrogenaz enziminde meydana gelen nokta mutasyonları düşük dereceli gliomalar, sekonder glioblastomlar, kondrosarkoma, kolanjiosarkoma ve akut miyeloid lösemi dâhil olmak üzere birçok maliniteye zemin hazırladığı gösterilmiştir [55]. 132. aminoasit olan arjininin histidinle yer değiştirdiği R132H mutasyonu bu enzimde en sık karşılaşılan mutasyondur. Bu mutasyonun enzimin aktivitesini tamamen inhibe edebileceği bilgisinin aksine neomorfik bir işlev kazanmasına sebep olur ve normalde substrat olarak ortaya çıkan α-KG'ı ürün olarak kullanır. Aynı zamanda hücresel düzeyde NADPH+H kaynağı olarak işlev gören $NADP^+$-bağımlı IDH1 enzimi, mutasyon sonucu NADPH+H tüketimine sebep olarak hücrede reaktif oksijen radikallerinin sebep olduğu hasarın onarımını engeller. Kanserli hücrelerde gözlenen R132H mutasyonundan başka R132C, R132G, R100Q, A134D, H133Q mutasyonları $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin genetik kodunda karşılaşılan diğer mutasyonlardır [131-135]. Literatürde normal ve mutant tip enzimler ile yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda ICT – α-KG dönüşümü sırasında açığa çıkan veya α-KG – (D)-2-HG dönüşümünde ise tüketilen NADPH molekülünün sebep olduğu 340 nm'deki absorbans değişiminden yola çıkılarak yapılan kinetik ölçümler ile enzimlerin katalitik aktivite ölçümlerinin yapılabildiği gösterilmiştir[6, 30, 136, 137]. Bu çalışmalar ile enzimin aktif bölgesini kodlayan genlerde gerçekleşecek bir nokta mutasyonunun enzimin aktivitesinde 300 ila 1340 kat kayıp ile sonuçlanabileceği bilgisine ulaşılmıştır. H133Q mutasyonunun ise 3,5 kat azalmaya sebep olarak, diğer mutasyonlara nispeten daha düşük bir aktivite kaybına yol açtığı belirtilmiştir [138]. Çift yönlü aktivite gösteren IDH1 enzimine $NADP^+$ ve ICT molekülünün indirgeyici karboksilasyon aktivitesi üzerinde inhibitör etki

yapmasına rağmen, NADPH ve α-KG moleküllerinin oksidatif dekarboksilasyon aktivitesinde ürün inhibisyon etkisi yapmadığı gözlemlenmiştir. Bu etkinin IDH1 enzimini $NADP^+$ ve ICT moleküllerine ilgisinin daha yüksek olmasından kaynaklandığı söylenmektedir[139]. IDH enzimlerinin aktivitelerinin değerlendirilmesi aşamasında deney ortamının pH 7.5 'te yeterli CO_2 konsantrasyonunun sağlanamaması sebebiyle IDH ve mutant türevlerinin ters reaksiyonun gerçekleşmeyeceği belirtilmiştir[139].

R132H mutasyonunun en sık görülen mutasyon olmasına rağmen en güçlü neomorfik aktivite gösteren mutasyon değildir. R132G mutasyonunun katıldığı reaksiyonda onkometabolit olarak üretilen (D)-2-HG konsantrasyonunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir[140].

Bir enzim aktivite tayin metodu geliştirilirken söz konusu enzim için uygun tampon, stok substrat ve enzimin çözeltilerinden küçük hacimlerde eklenerek her bileşenin son hacimde istenen konsatrasyona getirilmesi sağlanır. İyonlaşabilir gruplara sahip diğer herhangi bir bileşeni aşacak şekilde seçilen tampon bileşen, istenen reaksiyon pH'ına sahip bir $pK_a \pm 1$ değerine sahip olmalıdır. Tampon çözeltisi enzimin stabilite ve aktivitesi için gerekli tuzlar (NaCl veya KCl gibi), ozmolitler (polietilen glikol, gliserol veya sukroz gibi) ve indirgeme ajanlarını (2 -merkaptoetanol, ditiyotreitol veya TCEP gibi) uygun konsantrasyonda içermelidir. Tampon karışımı reaksiyonun gerçekleştirileceği sıcaklıkta istenen pH değerine titre edilmelidir. Bunlardan başka Tris gibi nitrojen içeren tampon çözeltilerinin sıcaklığa olan duyarlılığı göz önünde bulundurulmalıdır. pK_a değeri iyonik güce çok duyarlı olan fosfat tamponlarının seyreltilmesi pH değerini değiştireceğinden kullanımı sırasında özellikle dikkat edilmelidir. Reaksiyon karışımını ilk olarak enzim olmayan bileşenler olan su ve tampon karışımına stok substrat çözeltisini ekleyerek oluşturmak tavsiye edilmektedir. Karışımı belirlenen toplam hacme getirmek ve reaksiyonu başlatmak için yalnızca küçük bir miktar (% 10'u kadar) ilave edilecek şekilde bir enzim stok konsantrasyonu belirlenmesi stok tampon ve substrat konsantasyonlarındaki değişimin en aza indirilmesi açısından önemlidir [141]. Kinetik okumalarda küvet enzim eklendikten hemen sonra belirlenen dalga boyunda absorpsiyon veya emisyon ölçümü yapılması için programlanmış bir spektrofotometreye yerleştirilmelidir. End-point okumalarda ise reaksiyon karışımının belirli bir hacminin çıkarılması ve bu hacimde söndürme reaktifi ile karıştırılarak okuma yapılması önerilmektedir. Tüm bunlara ek olarak

enzim aktivite tayini çalışmalarında enzim içermeyen kontrol reaksiyon karışımı formüle edilerek katalizlenmeyen ürün oluşumu veya bileşenlerin yeterli çözünememesi sebebiyle meydana gelen arka plan sinyal miktarı belirlenmelidir. Bu değerler 'kör değeri' olarak kabul edilerek ölçüm sonucundan çıkarılmalıdır [142].

Çalışması yapılan $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH1 enziminin aktivite ölçüm çalışmalarında enzimin çok yavaş çalıştığı ve hızlı sonuç verilmesi gereken rutin biyokimya laboratuvarlarında kullanımına uygun olmadığı gözlemlenmiştir. Mutant enzimin NADPH tüketiminin yavaş olmasına ek olarak tümör hücrelerinde $NADP^+$-bağımlı normal IDH'in R132H mutant $NADP^+$-bağımlı IDH ile birlikte eksprese edilmesi α-KG'ye bağlı NADPH tüketimini artıracağı yönünde bilgiler mevcuttur [6]. Her iki hücre tipini bulundurması sebebiyle NADPH molekülünün bir yandan üretimi, bir yandan tüketimi enzimin tam otomatize aktivite kitinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır.

Üretilen enzimin kültür mayideki konsantrasyonunu artırma amacıyla kültür sıvıları – 80 ℃'de dondurularak liyofilizasyona tabi tutulmuştur. Bu işlem esnasında % 50 gliserol içerisinde bulunan normal tip enzimin hacminin 10'da birine düşürülmesi sonucunda aktivitesinde 4 kat artış gözlenmiştir. Kısa süreli (15 gün) stoklama durumunda – 20 ℃ ve + 4 ℃ sıcaklıklarda saklanan örnekler arasında belirgin aktivite farkı görülmemiştir. Yapılan bir çalışmada rekombinant üretilen enzimin – 80 ℃ 'de muhafaza edilmesinin 2 aydan kısa bir süre içerisinde enzimde aktivite kaybına yol açtığı bildirilmiştir[138].

Literatürde tümörlü hasta dokularından elde edilen hücre lizatları ile yapılan çalışmalarda ortamda α-KG ve NADPH varlığında NADPH konsantrasyonunun düştüğü gözlenmiştir. Farklı mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda üretilen rekombinant enzimlerin kinetik özellikleri şu şekilde bulunmuştur: $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin *E. coli* mikroorganizmasından ekspresyonu gerçekleştirilen bir çalışmada ICT için K_M değeri 65 μM [6] ; başka bir çalışmada ise K_M değeri 43 (±17) μM; ters karboksilasyon yönünde α-KG için K_M değeri 1.4 (± 0.2) mM olarak gözlenmiştir[139]. Bir başka çalışmada rekombinant üretilen $NADP^+$-bağımlı normal IDH enziminin izositrat için K_M değeri 5.0 ± 0.3 μM ; α-KG için K_M değeri 138 ±38 μM olarak hesaplanmıştır[143]. 2009 yılında yapılan bir çalışmada ise ICT için K_M değeri 6.2 μM olarak gözlenmiştir [144]. Spodoptera frugiperda canlısının overien dokusunda bulunan Sf9 hücreleriyle yapılan hücre kültürü çalışmasında rekombinant

üretilen $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin izositrat için K_M değeri 7 μM olarak gözlenirken ters karboksilasyon reaksiyonunda α-KG için K_M değeri 43 μM olarak bulunmuştur [145]. Farklı bir çalışmada rekombinant üretilen $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin izositrat için K_M değeri 220 μM (±20) olarak hesaplanmıştır [138]. $NADP^+$-bağımlı IDH ile yapılan çalışmalar Tablo 5.1 'de özetlenmiştir.

Tablo 5.1: Farklı çalışmalarda üretilen rekombinant $NADP^+$-bağımlı IDH K_M değerleri.

Aktivite alınan doku / Ekspresyon konağı konağı	**K_M - ICT**	**Referans**
E. coli – rekombinant üretim	65 μM	[6]
E. coli – rekombinant üretim	6.2 μM	[144]
Sf9 hücre kültürü – rekombinant üretim	7 μM	[145]
E. coli – rekombinant üretim	43 ±17 μM	[139]
E. coli – rekombinant üretim	5.0 ± 0.3 μM	[143]
E. coli – rekombinant üretim	220 μM	[138]
P. pastoris	108 μM	Bu çalışma

Literatürde rekombinant üretilen $NADP^+$-bağımlı normal IDH enziminin ICT için K_M değerleri 6.2 – 220 μM arasında değişkenlik göstermektedir. Bizim çalışmamızda üretilen rekombinant $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin K_M değeri 108 μM olarak hesaplanmıştır. Diğer çalışmalarda üretilen rekombinant enzimlerin bir çoğundan daha aktif bir enzim elde edilmiştir.

$NADP^+$-bağımlı mutant enzimin aktivitesinin ölçümü amacıyla klinik kimya analizörleri ile uyumlu kit geliştirme aşamasında literatürle uyumlu olarak enzimin aktivitesinden verim alınamaması sebebiyle istenen düzeyde çalışmalar gerçekleştirilememiştir. Aynı zamanda R132H ile NADPH kinetiğinin doğru bir şekilde belirlenmesi bu substrat için çok düşük K_M değeri nedeniyle zor olduğu bilgisi literatürde yer almaktadır [143]. Normal tip $NADP^+$-bağımlı IDH enziminin NADPH+H için 50-100 μM aralığında bir K_M gösterdiği halde, mutant enzim için bu değerin <500 nM olduğunu ve 100 katlık bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da spektrofotometrik olarak bu enzim aktivitesinin ölçümünü oldukça zor hale

getirmektedir. Oldukça yavaş çalışan ve düşük aktivite gösteren bu enzimin kinetik değerlendirmelerinin yapılmasının anlamlı olmadığı kanısına varılmıştır. Reaksiyonun çok uzun sürdüğü, yavaş gerçekleştiği düşünülmüş, hızlı ve doğru sonuç verilmesi gereken rutin biyokimya laboratuvarlarında kullanılan otomatik kimya analizörlerinde aplikasyona uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde farklı mikroorganizmalardan izole edilen NAD^+-bağımlı IDH enzimleri ve K_M değerleri Tablo 5.2 'de gösterilmiştir.

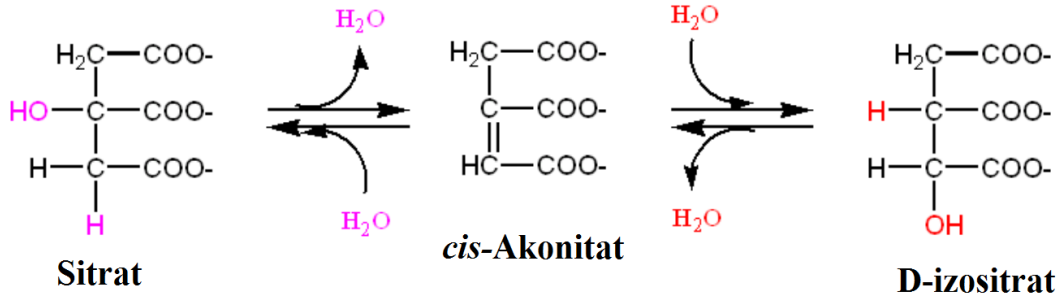
Tablo 5.2: İzole edilen NAD^+-bağımlı IDH enzimleri ve K_M değerleri.

Ekspresyonu yaptırılan mikroorganizma	**Km (mM)**	**Referans**
Pyrococcus furiosus	0.0680	[146]
Ostreococcus tauri	0.2260	[147]
Campylobacter curvus	0.136	[148]
Acidithiobacillus thiooxidans	0.1800	[149]
Pseudomonas sp.	0.017	[150]
Saccharomyces cerevisiae	0,210	[151]
Streptococcus mutans	0.0750	[152]
Helicobacter pylori	0.1240	[153]
Shewanella putrefaciens	0.404	Bu çalışma

Bu verilere göre çalışmalarımız sonucu üretilen NAD^+-bağımlı IDH enziminin izole edilen diğer mikroorganizmalardaki IDH enzimlerine göre daha düşük K_M 'e sahip olduğu, substratına daha yüksek afinite gösterdiği gözlenmiştir. Aktivitesi oldukça iyi ölçülebilen, pürifikasyonu yapılabilen bu üretim sonucu elde edilen rekombinant NAD^+-IDH enzimi kullanılarak farklı bir TCA döngüsü elemanı olan akonitaz enziminin aktivitesinin ölçümü denenmiştir. Hem mitokondride (Aco2) hem de sitoplazmada (Aco1) bulunan bir enzim olan akonitaz enzimi (Aco) TCA döngüsünde sitratın izo-sitrata tersinir izomerizasyonunu katalize eder [154]. Akonitaz enziminin fonksiyonunda meydana gelecek değişikliklerin hücrede lipitlerin sentezi ve β-oksidasyonunda artma sonucu hücrenin enerji metabolizmasında değişikliğe sebep olarak metabolik 'shift'i meydana getirir. Bu değişikliğin hücrede kanser gelişimine sebep olduğu düşünülmektedir [155]. Yapılan bir çalışmada fumaraz hidrataz (FH) enziminin genetik kodunda mutasyon bulunan hücrelerin bozulmuş akonitaz sentaz 2

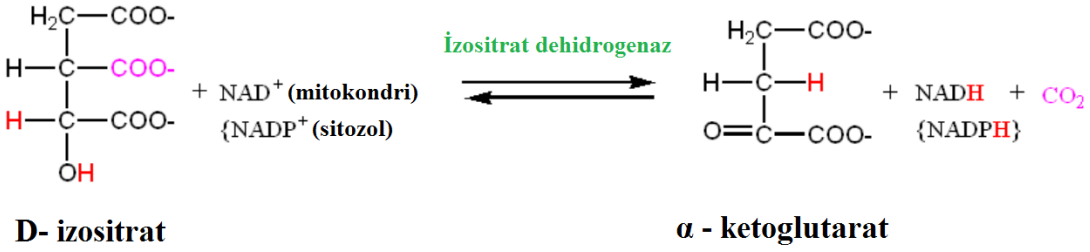
enzim aktivitesi gösterdiği, bunun sonucunda da kalıtsal leiomyomatozis ve renal hücreli karsinoma gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir [156]. Bu kanser türlerinden başka mide kanseri ve prostat kanseri ile de ilişkili olduğu açıklanmıştır [157, 158]. Prostat kanserinde Aco2 enziminin aktivitesinde azalma ile hücre içine çinko alımını kontrol eden proteinlerin (ZIP 1) down-regülasyonu arasında ilişki gözlenmiştir. ZIP 1, prostat kanserinde çinkonun tükenmesine neden olabilecek bir çinko taşıyıcısıdır. Bu değişiklik hücre içerisinde sitrat oksidasyonunu bozarak prostat hücrelerinin metabolik farklılaşmasına yol açar ve sitrat salgılayan non-neoplastik epitel hücrelerinin sitratı oksitleyen prostatik karsinom hücrelerine dönüşümünü uyarır [155, 157].

Klinik olarak yüksek öneme sahip akonitaz enziminin katalizlediği TCA siklüsünün 2. Basamağını oluşturan reaksiyon Şekil 5.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1: Akonitaz enziminin katalizlediği reaksiyon.

TCA siklüsünün akonitaz basamağından sonraki basamağını oluşturan izositrat dehidrdogenaz enzim basamağı ise Şekil 5.2 'de gösterilmiştir.



Şekil 5.2: TCA siklüsünün 3. basamağı olan IDH enzimi reaksiyonu.

Akonitaz enziminin aktivitesini ölçmek amacıyla bir reaksiyon ortamına akonitaz enziminin substratı olan sitrat molekülünün eklenmesi sonucu reaksiyonun gerçekleşebileceği ve ürün olarak izositrat oluşacağı düşünülmüştür. Rekombinant üretilen NAD^+-bağımlı IDH enziminin koenzim ve kofaktörleri ile ortama eklenmesi sonucu akonitaz enziminin ürünü olan izositratın substrat olarak kullanılarak α-KG

oluşumunu katalizleyeceği ve reaksiyon ortamında 340 nm de absorbans veren NADH molekülü konsantrasyonunun artışından akonitaz enziminin aktivitesinin ölçülebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan ön çalışmalar neticesinde 200 mM pH=pK_a Tris tamponu, 4 mM $MgSO_4$, 4 mM NAD^+, 250 mM NaCl, 200 µL / 10 mL rekombinant NAD^+-IDH enzimi olarak hazırlanan birinci reaktif ile 200 mM pH=pK_a Tris tamponu, 2 mM NAD^+, 6 mM, 50 mM sodyum sitrat olarak hazırlanan ikinci reaktifin karıştırılarak serumdan gelen akonitaz enziminin aktivitesinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar olumlu sonuç vermiş üretilen rekombinant NAD^+-bağımlı IDH enzimi farklı bir enzim aktivitesinin ölçümü için tasarlanan kit içerisinde kullanılarak akonitaz enziminin serumdan aktivitesinin ölçümünü mümkün hale getirmiştir. Ön çalışma olarak başlanan bu kitin standardizasyonu için çalışmalar devam etmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışması sonucunda $NADP^+$-bağımlı normal IDH enziminin rekombinant üretimi ve enzim aktivitesinin ölçümü tam otomatize kimya analizörüne uyumlu kit geliştirme aşamaları başarıyla tamamlanmıştır. Bu sayede $NADP^+$-bağımlı normal IDH enzim aktivite ölçümünün klinikte kullanımı mümkün olacaktır. Geliştirilen teknik ile IDH enzim aktivitesinin hastalıklar ve tüm diğer klinik durumlar ile ilişkisi, genetik varyansı, ilişkili olduğu hastalıklarda tanı, tedavi ve klinik seyri ile ilişkisi hakkında araştırmalar yapılmasına olanak sağlanmıştır. Çalışmaları tamamlanan bu kitin içeriği şu şekildedir:

- 0.1 M pH=pK_a Tris Tamponu
- 0.5 mM $NADP^+$
- 4 mM $MgSO_4$
- 10 mM izositrat
- 40 mM KCl
- % 1 gliserol
- % 0.1 NaN_3

+4 ºC ‘de 90 gün stabil olduğu gözlenen bu kit oto-analizör ile uyumlu olması açısından alanında tek olup muadili bulunmamaktadır. Bu amaçla ‘$NADP^+$-bağımlı izositrat dehidrogenaz enzim aktivitesi ölçüm metodu’ adıyla patent başvurusu yapılmıştır. Kitin standardize edilerek ticari boyutta üretime başlanması durumunda ülkemizde üretilen ve tüm dünyada pazar payına sahip yerli ve milli bir ürün ortaya konulmuş olacaktır.

Üretilen NAD^+-bağımlı IDH enziminin akonitaz enzimi aktivitesi ölçümünde kullanılması planlanmıştır. Bu amaçla yapılan ön çalışmalar olumlu sonuç vermiş, amaçlanan kitin optimizasyonu ve standardizasyonu için çalışmalar devam etmektedir.

İstenilen verim alınamayan rekombinant $NADP^+$-bağımlı R132H mutant IDH üretimden elde edilen enzimler için ise verimi ve aktiviteyi artırmaya yönelik farklı teknikler uygulanabilir. Glikozilasyon ile enzimin stablitesi ve aktivitesini artırmaya

yönelik çalışmalar yapılabilir. Üretilen enzimin saflaştırılması amacıyla kromatografik metotlardan yararlanılabilir.

Düşük sayıda ve rasgele seçilen numunelerle yapılan çalışmalar neticesinde bazı hasta serumlarında bu enzimin aktivitesinde belirgin artış gözlenirken, ALT, AST gibi karaciğer ile ilgili diğer enzim aktivitelerinde referans aralığının oldukça üstünde değerler elde edilen bazı numunelerde ise belirgin artış gözlemlenmemiştir. Klinik bilimler ile işbirliği sağlanarak yapılabilecek bir çalışma neticesinde bu fark araştırılarak anlamlandırılabilir.

Bu tez çalışması rekombinant olarak üretilmiş iki enzim, birinin içerisinde bu enzimlerden biri kullanılarak geliştirilmiş iki tam-otomatize enzim aktivitesi ölçüm kiti olmak üzere 4 ürün üretilmesiyle sonuçlanmıştır.

KAYNAKLAR

[1] **Ma, T., Peng, Y., Huang, W. & Ding, J.** (2017). Molecular mechanism of the allosteric regulation of the alphagamma heterodimer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *Scientific Reports*, *7*, 40921.

[2] **Koh, H. J., Lee, S. M., Son, B. G., Lee, S. H., Ryoo, Z. Y., & Chang, K. T.** (2004). Cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(38), 39968-39974.

[3] **Carl A. Burtis, E. R. A.** (1999). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3 ed. London: Elsevier Health Sciences.

[4] **Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., & Angenendt, P.**(2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, *321*(5897), 1807-1812.

[5] **Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., & Cavenee, W. K.** (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803-820.

[6] **Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., & Driggers, E. M.**(2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, *462*(7274), 739-744.

[7] **Gross, S., Cairns, R. A., Minden, M. D., Driggers, E. M., Bittinger, M. A., & Jang, H. G.** (2010). Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(2), 339-344.

[8] **Dang, L., Yen, K. & Attar, E. C.** (2016). IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Annals of Oncology*, *27*(4), 599-608.

[9] **Al-Khallaf, H.** (2017). Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. *Cell Bioscience*, *7*, 37.

[10] **Arita, H., Narita, Y., Yoshida, A., Hashimoto, N., Yoshimine, T. & Ichimura, K.** (2015). IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathology*, *32*(2), 79-89.

[11] **Prilusky, J., Hodis, E., Canner, D., Decatur, W. A., Oberholser, K., & Martz, E.** (2011). Proteopedia: a status report on the collaborative, 3D web-encyclopedia of proteins and other biomolecules. *Journal of Structural Biology*, *175*(2), 244-252.

[12] **Ochoa, S.** (1948). Biosynthesis of tricarboxylic acids by carbon dioxide fixation; enzymatic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, *174*(1), 133-157.

[13] **Bradshaw, P. C.** (2019). Cytoplasmic and Mitochondrial NADPH-Coupled Redox Systems in the Regulation of Aging. *Nutrients*, *11*(3).

[14] **Miller, C. G., Holmgren, A., Arner, E. S. J. & Schmidt, E. E.** (2018). NADPH-dependent and -independent disulfide reductase systems. *Free Radical Biology and Medicine*, *127*, 248-261.

[15] **Wise, D. R., Ward, P. S., Shay, J. E., Cross, J. R., Gruber, J. J., & Sachdeva, U. M.** (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(49), 19611-19616.

[16] **Mullen, A. R., Wheaton, W. W., Jin, E. S., Chen, P.-H., Sullivan, L. B., & Cheng, T.** (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*, *481*(7381), 385-388.

[17] **Menendez, J. A. & Lupu, R.** (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Review of Cancer*, *7*(10), 763-777.

[18] **DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., & Wehrli, S.** (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *104*(49), 19345-19350.

[19] **Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X. Y., & Pfeiffer, H. K.** (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *105*(48), 18782-18787.

[20] **Le, A., Lane, A. N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., & Barbi, J.** (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metabolism*, *15*(1), 110-121.

[21] **Toedt, G., Barbus, S., Wolter, M., Felsberg, J., Tews, B., & Blond, F.** (2011). Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. *International Journal of Cancer*, *128*(5), 1095-1103.

[22] **Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., & Salama, S. R.** (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, *155*(2), 462-477.

[23] **Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J. & Ducray, F.** (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(25), 4150-4154.

[24] **Weller, M., Felsberg, J., Hartmann, C., Berger, H., Steinbach, J. P., & Schramm, J.** (2009). Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *Journal of Clinical Oncology,*, *27*(34), 5743-5750.

[25] **Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, & W.** (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine. 360*(8), 765-773.

[26] **Paschka, P., Schlenk, R. F., Gaidzik, V. I., Habdank, M., Krönke, J., & Bullinger, L.** (2010). IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *Journal of Clinical Oncology*. *28*(22), 3636-3643.

[27] **Borger, D. R., Tanabe, K. K., Fan, K. C., Lopez, H. U., Fantin, V. R., & Straley, K. S.** (2012). Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist*, *17*(1), 72-79.

[28] **Amary, M. F., Bacsi, K., Maggiani, F., Damato, S., Halai, D., & Berisha, F.** (2011). IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *Journal of Pathology*, *224*(3), 334-343.

[29] **Labussière, M., Idbaih, A., Wang, X. W., Marie, Y., Boisselier, B., & Falet, C.** (2010). All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology*, *74*(23), 1886-1890.

[30] **Ward, P. S., Patel, J., Wise, D. R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B. D., & Coller, H. A.** (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, *17*(3), 225-234.

[31] **Bleeker, F. E., Lamba, S., Leenstra, S., Troost, D., Hulsebos, T., Vandertop, & W. P.** (2009). IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Human Mutation. 30*(1), 7-11.

[32] **Dang, L., Jin, S. & Su, S. M.** (2010). IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends in Molecular Medicine. 16*(9), 387-397.

[33] **Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., & Wang, P.** (2009). Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science (New York, NY)*, *324*(5924), 261-265.

[34] **Knudson, A. G., Jr.** (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*(4), 820-823.

[35] **Núñez, F. J., Mendez, F. M., Kadiyala, P., Alghamri, M. S., Savelieff, M. G., & Garcia-Fabiani, M. B.** (2019). IDH1-R132H acts as a tumor suppressor in glioma via epigenetic up-regulation of the DNA damage response. *Science Translational Medicine. 11*(479).

[36] **Gálvez, S. & Gadal, P.** (1995). On the function of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in living organisms. *Plant Science*, *105*(1), 1-14.

[37] **Reiter-Brennan, C., Semmler, L. & Klein, A.** (2018). The effects of 2-hydroxyglutarate on the tumorigenesis of gliomas. *Contemporary oncology*, *22*(4), 215-222.

[38] **Kranendijk, M., Struys, E. A., Salomons, G. S., Van der Knaap, M. S. & Jakobs, C.** (2012). Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(4), 571-587.

[39] **Losman, J. A. ve Kaelin, W. G., Jr.** (2013). What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Development*, *27*(8), 836-852.

[40] **Moroni, I., Bugiani, M., D'Incerti, L., Maccagnano, C., Rimoldi, M., … & Bissola, L.** (2004). L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain malignant tumors: a predisposing condition? *Neurology*, *62*(10), 1882-1884.

[41] **Haliloglu, G., Jobard, F., Oguz, K. K., Anlar, B., Akalan, N., … & Coskun, T.** (2008). L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain tumors in children with mutations in the L2HGDH gene: neuroimaging findings. *Neuropediatrics*, *39*(2), 119-122.

[42] **Ozişik, P. A., Akalan, N., Palaoğlu, S. & Topçu, M.** (2002). Medulloblastoma in a child with the metabolic disease L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Pediatric Neurosurgery*, *37*(1), 22-26.

[43] **Loenarz, C. & Schofield, C. J.** (2008). Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Natural Chemical Bioogyl*, *4*(3), 152-156.

[44] **D'Oto, A., Tian, Q. W., Davidoff, A. M. & Yang, J.** (2016). Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. *Journal of Medical Oncology and Therapeutics. 1*(2), 34-40.

[45] **Janke, R., Iavarone, A. T. & Rine, J.** (2017). Oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate enhances gene silencing through inhibition of specific H3K36 histone demethylases. *Elife*, *6*.

[46] **Chowdhury, R., Yeoh, K. K., Tian, Y. M., Hillringhaus, L., Bagg, E. A., Rose, N. R., … & Kawamura, A.** (2011). The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Reports*, *12*(5), 463-469.

[47] **Ross, S. E. & Bogdanovic, O.** (2019). TET enzymes, DNA demethylation and pluripotency. *Biochemical Society Transactions 47*(3), 875-885.

[48] **Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., … & Kim, S. H.** (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, *19*(1), 17-30.

[49] **Figueroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., … & Shih, A.** (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, *18*(6), 553-567.

[50] **Wang, P., Wu, J., Ma, S., Zhang, L., Yao, J., Hoadley, … & K. A.** (2015). Oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate Inhibits ALKBH DNA Repair Enzymes and Sensitizes IDH Mutant Cells to Alkylating Agents. *Cell Reports*, *13*(11), 2353-2361.

[51] **Inoue, S., Li, W. Y., Tseng, A., Beerman, I., Elia, A. J., … & Bendall, S. C.**(2016). Mutant IDH1 Downregulates ATM and Alters DNA Repair and Sensitivity to DNA Damage Independent of TET2. *Cancer Cell*, *30*(2), 337-348.

[52] **Cremona, C. A. & Behrens, A.** (2014). ATM signalling and cancer. *Oncogene*, *33*(26), 3351-3360.

[53] **Wang, Y., Wild, A. T., Turcan, S., Wu, W. H., Sigel, C., … & Klimstra, D. S.** (2020). Targeting therapeutic vulnerabilities with PARP inhibition and radiation in IDH-mutant gliomas and cholangiocarcinomas. *Science Advances*, *6*(17), eaaz3221.

[54] **Lu, Y., Kwintkiewicz, J., Liu, Y., Tech, K., Frady, L. N., … & Su, Y. T.** (2017). Chemosensitivity of IDH1-Mutated Gliomas Due to an Impairment in PARP1-Mediated DNA Repair. *Cancer Research*, *77*(7), 1709-1718.

[55] **Liu, Y., Lang, F., Chou, F. J., Zaghloul, K. A. & Yang, C.** (2020). Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: Genetics, Biochemistry, and Clinical Indications. *Biomedicines*, *8*(9).

[56] **Magnani, F. & Mattevi, A.** (2019). Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, *59*, 91-97.

[57] **Shi, J., Sun, B., Shi, W., Zuo, H., Cui, D., … & Ni, L.** (2015). Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation. *Tumor Biology*, *36*(2), 655-662.

[58] **Gelman, S. J., Naser, F., Mahieu, N. G., McKenzie, L. D., Dunn, G. P., … & Chheda, M. G. (**2018). Consumption of NADPH for 2-HG Synthesis Increases Pentose Phosphate Pathway Flux and Sensitizes Cells to Oxidative Stress. *Cell Reports*, *22*(2), 512-522.

[59] **Liu, Y., Lu, Y., Celiku, O., Li, A., Wu, Q., … & Zhou, Y.** (2019). Targeting IDH1-Mutated Malignancies with NRF2 Blockade. *Journal of the National Cancer Institute*, *111*(10), 1033-1041.

[60] **Yu, D., Liu, Y., Zhou, Y., Ruiz-Rodado, V., Larion, M., … & Xu, G.** (2020). Triptolide suppresses IDH1-mutated malignancy via Nrf2-driven glutathione metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(18), 9964-9972.

[61] **Liu, A., Hou, C., Chen, H., Zong, X. & Zong, P.** (2016). Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. *Frontiers in Oncology*, *6*(16).

[62] **Han, S., Liu, Y., Cai, S. J., Qian, M., Ding, J., … & Larion, M.** (2020). IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British Journal of Cancer*, *122*(11), 1580-1589.

[63] **Chen, H., Judkins, J., Thomas, C., Wu, M., Khoury, L., … & Benjamin, C. G.** (2017). Mutant IDH1 and seizures in patients with glioma. *Neurology*, *88*(19), 1805-1813.

[64] **Yang, Y., Mao, Q., Wang, X., Liu, Y., Mao, Y., … & Zhou, Q.** (2016). An analysis of 170 glioma patients and systematic review to investigate the

association between IDH-1 mutations and preoperative glioma-related epilepsy. *Journal of Clinical Neuroscience, 31*, 56-62.

[65] **Liubinas, S. V., D'Abaco, G. M., Moffat, B. M., Gonzales, M., Feleppa, F., … & Nowell, C. J.** (2014). IDH1 mutation is associated with seizures and protoplasmic subtype in patients with low-grade gliomas. *Epilepsia*, *55*(9), 1438-1443.

[66] **Stockhammer, F., Misch, M., Helms, H. J., Lengler, U., Prall, F., ….. & von Deimling, A.** (2012). IDH1/2 mutations in WHO grade II astrocytomas associated with localization and seizure as the initial symptom. *Seizure, 21*(3), 194-197.

[67] **Rohle, D., Popovici-Muller, J., Palaskas, N., Turcan, S., Grommes, C., ….. & Campos, C.** (2013). An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science (New York, NY), 340*(6132), 626-630.

[68] **Camelo-Piragua, S., Jansen, M., Ganguly, A., Kim, J. C., Louis, D. N. & Nutt, C. L.** (2010). Mutant IDH1-specific immunohistochemistry distinguishes diffuse astrocytoma from astrocytosis. *Acta Neuropathology, 119*(4), 509-511.

[69] **Bal, D. & Gryff-Keller, A.** (2002). 1H and 13C NMR study of 2-hydroxyglutaric acid and its lactone. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *40*(8), 533-536.

[70] **Andronesi, O. C., Rapalino, O., Gerstner, E., Chi, A., Batchelor, T. T., ... & Cahill, D. P.** (2013). Detection of oncogenic IDH1 mutations using magnetic resonance spectroscopy of 2-hydroxyglutarate. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(9), 3659-3663.

[71] **Gabriel, J. L., Zervos, P. R. & Plaut, G. W.** (1986). Activity of purified NAD-specific isocitrate dehydrogenase at modulator and substrate concentrations approximating conditions in mitochondria. *Metabolism*, *35*(7), 661-667.

[72] **Sun, P., Ma, T., Zhang, T., Zhu, H., Zhang, J., … & Liu, Y.** (2019). Molecular basis for the function of the αβ heterodimer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(44), 16214-16227.

[73] **Kim, Y. O., Koh, H. J., Kim, S. H., Jo, S. H., Huh, J. W., … & Jeong, K. S.** (1999). Identification and functional characterization of a novel, tissue-specific NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase beta subunit isoform. ournal of *Biological Chemiistry*, *274*(52), 36866-36875.

[74] **Krell, D., Assoku, M., Galloway, M., Mulholland, P., Tomlinson, I. & Bardella, C.** (2011). Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma. *PLoS One, 6*(5), e19868.

[75] **Akram, M.** (2014). Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *68*(3), 475-478.

[76] **Chung, Y. H., Kim, J. A., Song, B. C., Song, I. H., Koh, M. S., … & Lee, H. C.** (2001). Isocitrate dehydrogenase as a marker of centrilobular hepatic

necrosis in the experimental model of rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *16*(3), 328-332.

[77] **Scheig, R.** (1996). Evaluation of tests used to screen patients with liver disorders. *Primary Care*, *23*(3), 551-560.

[78] **Burtis, C. A., Ashwood, E. R. & Bruns, D. E.** (1999). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 4 ed: Clinical Chemistry.

[79] **Welsh, F. A.** (1972). Changes in distribution of enzymes within the liver lobule during adaptive increases. *J Histochemical Cytochemistry*, *20*(2), 107-111.

[80] **Guder, W. G. & Schmidt, U.** (1976). Liver cell heterogeneity. The distribution of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the liver lobule of fed and starved rats. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, *357*(12), 1793-1800.

[81] **Chung, Y. H., Jung, S. A., Song, B. C., Chang, W. Y., Kim, J. A., ... & Song, I. H.** (2001). Plasma isocitrate dehydrogenase as a marker of centrilobular hepatic necrosis in patients with hyperthyroidism. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *33*(2), 118-122.

[82] **Stanger, B. Z.** (2015). Probing hepatocyte heterogeneity. *Cell Research*, *25*(11), 1181-1182.

[83] **Mehmetoğlu, İ.** (2013). *Klinik Biyokimya El Kitabı*. Konya, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevi.

[84] **Michael Danson, R. E.** (2002). *Enzyme Assays A Practical Approach.* 2 ed. London: Oxford Universtiy Press.

[85] **Roskoski, R.** (2014). Enzyme Assays. *Reference Module in Biomedical Sciences*: Elsevier.

[86] **Pum, J.** (2019). A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Advanced Clinical Chemistry*, *90*, 215-281.

[87] **Kiełbasa, A., Gadzała-Kopciuch, R. & Buszewski, B.** (2016). Reference Materials: Significance, General Requirements, and Demand. *Critical Review in Analitical Chemistry*, *46*(3), 224-235.

[88] **Demain, A. L. ve Vaishnav, P.** (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, *27*(3), 297-306.

[89] **Brown, T. A.** (2010). *Gene Cloning and DNA Analysis*. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.

[90] **Terpe, K.** (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applications of Microbioogical Biotechnology*, *72*(2), 211-222.

[91] **Schumann, W.** (2007). Production of recombinant proteins in Bacillus subtilis. *Advanced Applications of Microbiology*, *62*, 137-189.

[92] **He, X. S., Brückner, R. & Doi, R. H.** (1991). The protease genes of Bacillus subtilis. *Research in Microbiology. 142*(7-8), 797-803.

[93] **Davison, S. A., den Haan, R. & van Zyl, W. H.** (2020). Exploiting strain diversity and rational engineering strategies to enhance recombinant cellulase

secretion by Saccharomyces cerevisiae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *104*(12), 5163-5184.

[94] **Yurimoto, H., Oku, M. & Sakai, Y.** (2011). Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *International Journal of Microbiology.2011*, 101298.

[95] **Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., ... & Hoseinpoor, R.** (2019). Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology*, *61*(5), 365-384.

[96] **Yurimoto, H. & Sakai, Y.** (2019). Methylotrophic Yeasts: Current Understanding of Their C1-Metabolism and its Regulation by Sensing Methanol for Survival on Plant Leaves. *Current Issues in Molecular Biology 33*, 197-210.

[97] **Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M. & Wiebe, M. G.** (2017). Single Cell Protein—State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*, *8*(2009).

[98] **Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y. & Madden, K. R.** (1985). Pichia pastoris as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, *5*(12), 3376-3385.

[99] **Hartner, F. S., Ruth, C., Langenegger, D., Johnson, S. N., Hyka, P., … & Lin-Cereghino, G. P.** (2008). Promoter library designed for fine-tuned gene expression in Pichia pastoris. *Nucleic Acids Research*, *36*(12), e76.

[100] **Kranthi, B. V., Balasubramanian, N. & Rangarajan, P. N.** (2006). Isolation of a single-stranded DNA-binding protein from the methylotrophic yeast, Pichia pastoris and its identification as zeta crystallin. *Nucleic Acids Research*, *34*(14), 4060-4068.

[101] **Kranthi, B. V., Kumar, R., Kumar, N. V., Rao, D. N. & Rangarajan, P. N.** (2009). Identification of key DNA elements involved in promoter recognition by Mxr1p, a master regulator of methanol utilization pathway in Pichia pastoris. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1789*(6-8), 460-468.

[102] **Parua, P. K., Ryan, P. M., Trang, K. & Young, E. T.** (2012). Pichia pastoris 14-3-3 regulates transcriptional activity of the methanol inducible transcription factor Mxr1 by direct interaction. *Molecular Microbiology*, *85*(2), 282-298.

[103] **Eiden-Plach, A., Zagorc, T., Heintel, T., Carius, Y., Breinig, F. & Schmitt, M. J.** (2004). Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by Candida glabrata, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae, and Schizosaccharomyces pombe. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(2), 961-966.

[104] **Shi, X. L., Feng, M. Q., Shi, J., Shi, Z. H., Zhong, J. & Zhou, P.** (2007). High-level expression and purification of recombinant human catalase in Pichia pastoris. *Protein Expression and Purification*, *54*(1), 24-29.

[105] **Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. & Schwab, H.** (2014). Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(12), 5301-5317.

[106] **pPICZalpha, V.** Harvard Medical School, Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology. (2020). Erişim tarihi: 20 Ekim 2020 https://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/GetVectorDetail.do?vectorid=275

[107] **Lewis, C. A., Parker, S. J., Fiske, B. P., McCloskey, D., Gui, D. Y.,… & Green, C. R.** (2014). Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondria of mammalian cells. *Molecular Cell*, *55*(2), 253-263.

[108] **Gietz, R. D. & Schiestl, R. H.** (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, *2*(1), 31-34.

[109] **Butterworth, P. J.** (2005). *Fundamentals of enzyme kinetics* (3rd edn) A. Cornish-Bowden. Portland Press Ltd, London, 422 + xvi pp., ISBN 1 85578 158 1 (2000). *Cell Biochemistry and Function*, *23*(4), 292-292.

[110] **Kirsch, J. F.** *Enzyme kinetics and mechanism, by Paul F. Cook and W.W. Cleland*. (2008) *Protein Science,* Feb;17(2):380-1. doi: 10.1110/ps.073353008.

[111] **Charlotte W. Pratt, K. C.** (2014). *Essential Biochemistry*. 3 ed. Kendallville, USA: WILEY.

[112] **CLSI**. (2014). *User Verification of Precision and Estimation of Bias: Approved Guideline*. 3 ed. Wayne, Pennsylvania.

[113] **Boris Iglewicz, D. H.** (2004) How To Detect And Handle Outliers. Milwaukee, Wis. : ASQC Quality Press.

[114] **Joint Committee for Guides in Metrology. (**2012). International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms. 3 ed. Fransa: JCGM; s.

[115] **Çağlar, H. G.** (2019) *Tam Otomatik Bakır Ölçüm Kitinin Geliştirilmesi* (Doktora tezi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi).

[116] **Shrivastava, A.** (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, *2*, 21-25.

[117] **Armbruster, D. A. & Pry, T.** (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews, 29 Suppl 1*(Suppl 1), S49-52.

[118] **Dimeski, G.** (2008). Interference testing. *The Clinical Biochemist Reviews, 29 Suppl 1*(Suppl 1), S43-48.

[119] **Desideri, E., Vegliante, R. & Ciriolo, M. R.** (2015). Mitochondrial dysfunctions in cancer: genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity. *Cancer Letter*, *356*(2 Pt A), 217-223.

[120] **Warburg, O.** (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, NY)*, *123*(3191), 309-314.

[121] **Nowicki, S. & Gottlieb, E.** (2015). Oncometabolites: tailoring our genes. *The FEBS Journal*, *282*(15), 2796-2805.

[122] **Nam, H., Campodonico, M., Bordbar, A., Hyduke, D. R., Kim, S., ... & Zielinski, D. C.** (2014). A Systems Approach to Predict Oncometabolites via

Context-Specific Genome-Scale Metabolic Networks. *PLOS Computational Biology, 10*(9), e1003837.

[123] Farshidfar, F., Zheng, S., Gingras, M. C., Newton, Y., Shih, J., … & Robertson, A. G.. (2017). Integrative Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant Molecular Profiles. *Cell Rep, 18*(11), 2780-2794.

[124] Kantorovich, V., King, K. S. & Pacak, K. (2010). SDH-related pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 24*(3), 415-424.

[125] Astuti, D., Douglas, F., Lennard, T. W., Aligianis, I. A., Woodward, E. R., … &Evans, D. G. (2001). Germline SDHD mutation in familial phaeochromocytoma. *Lancet, 357*(9263), 1181-1182.

[126] Prasad, P., Kant, J. A., Wills, M., O'Leary, M., Lovvorn, H., 3rd & Yang, E. (2009). Loss of heterozygosity of succinate dehydrogenase B mutation by direct sequencing in synchronous paragangliomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics, 192*(2), 82-85.

[127] Baysal, B. E. (2007). A recurrent stop-codon mutation in succinate dehydrogenase subunit B gene in normal peripheral blood and childhood T-cell acute leukemia. *PLoS One, 2*(5), e436.

[128] Launonen, V., Vierimaa, O., Kiuru, M., Isola, J., Roth, S. ... & Pukkala, E. (2001). Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98*(6), 3387-3392.

[129] Çaliskan, E., Bodur, S., Ulubay, M., Özmen, I., Çiçek, A. F., … & Deveci, G. (2017). Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome: a case report and implications of early onset. *Anais Brasileiros de Dermatologia, 92*(5 Suppl 1), 88-91.

[130] Lehtonen, H. J. (2011). Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: update on clinical and molecular characteristics. *Familial Cancer, 10*(2), 397-411.

[131] Ichimura, K., Pearson, D. M., Kocialkowski, S., Backlund, L. M., Chan, R., … & Jones, D. T. (2009). IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neurology Oncoogyl, 11*(4), 341-347.

[132] Grassian, A. R., Pagliarini, R. & Chiang, D. Y. (2014). Mutations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Current Opinion in Gastroenterology, 30*(3), 295-302.

[133] Hirata, M., Sasaki, M., Cairns, R. A., Inoue, S., Puviindran, V., … & Li, W. Y. (2015). Mutant IDH is sufficient to initiate enchondromatosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112*(9), 2829-2834.

[134] Ward, P. S., Cross, J. R., Lu, C., Weigert, O., Abel-Wahab, O., … & Levine, R. L. (2012). Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene, 31*(19), 2491-2498.

[135] **Hemerly, J. P., Bastos, A. U. & Cerutti, J. M.** (2010). Identification of several novel non-p.R132 IDH1 variants in thyroid carcinomas. *European Journal of Endocrinology, 163*(5), 747-755.

[136] **Pietrak, B., Zhao, H., Qi, H., Quinn, C., Gao, E., … & Boyer, J. G..** (2011). A tale of two subunits: how the neomorphic R132H IDH1 mutation enhances production of αHG. *Biochemistry, 50*(21), 4804-4812.

[137] **Jin, G., Reitman, Z. J., Spasojevic, I., Batinic-Haberle, I., Yang, J., … & Schmidt-Kittler, O.** (2011). 2-hydroxyglutarate production, but not dominant negative function, is conferred by glioma-derived NADP-dependent isocitrate dehydrogenase mutations. *PLoS One, 6*(2), e16812.

[138] **Avellaneda Matteo, D., Grunseth, A. J., Gonzalez, E. R., Anselmo, S. L., Kennedy, M. A., … & Moman, P.** (2017). Molecular mechanisms of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations identified in tumors: The role of size and hydrophobicity at residue 132 on catalytic efficiency. *Journal of Biological Chemistry, 292*(19), 7971-7983.

[139] **Leonardi, R., Subramanian, C., Jackowski, S. & Rock, C. O.** (2012). Cancer-associated isocitrate dehydrogenase mutations inactivate NADPH-dependent reductive carboxylation. *Journal of Biological Chemistry, 287*(18), 14615-14620.

[140] **Pusch, S., Schweizer, L., Beck, A. C., Lehmler, J. M., Weissert, S., … & Balss, J.,** (2014). D-2-Hydroxyglutarate producing neo-enzymatic activity inversely correlates with frequency of the type of isocitrate dehydrogenase 1 mutations found in glioma. *Acta Neuropathology Communications, 2*, 19.

[141] **House, J.** (2007). *Principles of Chemical Kinetics*. 2 ed. USA: Academic Press.

[142] **Harris, T. K. & Keshwani, M. M.** (2009). Measurement of Enzyme Activity. İçinde R.R. Burgess, M.P. Deutscher, (Ed.), *Methods in Enzymology* Cilt 463, ss. 57-71). USA: Academic Press.

[143] **Rendina, A. R., Pietrak, B., Smallwood, A., Zhao, H., Qi, H., … & Quinn, C.,**(2013). Mutant IDH1 enhances the production of 2-hydroxyglutarate due to its kinetic mechanism. *Biochemistry, 52*(26), 4563-4577.

[144] **Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., … & Wang, P.**(2009). Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science, 324*(5924), 261-265.

[145] **Pietrak, B., Zhao, H., Qi, H., Quinn, C., Gao, E., … & Boyer, J. G.** (2011). A Tale of Two Subunits: How the Neomorphic R132H IDH1 Mutation Enhances Production of αHG. *Biochemistry, 50*(21), 4804-4812.

[146] **Steen, I. H., Lien, T., Madsen, M. S. & Birkeland, N. K.** (2002). Identification of cofactor discrimination sites in NAD-isocitrate dehydrogenase from Pyrococcus furiosus. *Archives Microbiology, 178*(4), 297-300.

[147] **Tang, W. G., Song, P., Cao, Z. Y., Wang, P. & Zhu, G. P.** (2015). A unique homodimeric NAD^+-linked isocitrate dehydrogenase from the smallest autotrophic eukaryote Ostreococcus tauri. *FASEB Journal, 29*(6), 2462-2472.

[148] **Wang, P., Lv, C. & Zhu, G.** (2015). Novel type II and monomeric NAD+ specific isocitrate dehydrogenases: phylogenetic affinity, enzymatic characterization, and evolutionary implication. *Scientific Reports*, *5*, 9150.

[149] **Inoue, H., Tamura, T., Ehara, N., Nishito, A., Nakayama, Y., … & Maekawa, M.,** (2002). Biochemical and molecular characterization of the NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from the chemolithotroph Acidithiobacillus thiooxidans. *FEMS Microbiology Letters*, *214*(1), 127-132.

[150] **Crousilles, A., Dolan, S. K., Brear, P., Chirgadze, D. Y. & Welch, M.** (2018). Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(37), 14260-14269.

[151] **Cupp, J. R. & McAlister-Henn, L.** (1992). Cloning and characterization of the gene encoding the IDH1 subunit of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(23), 16417-16423.

[152] **Wang, P., Song, P., Jin, M. & Zhu, G.** (2013). Isocitrate dehydrogenase from Streptococcus mutans: biochemical properties and evaluation of a putative phosphorylation site at Ser102. *PLoS One*, *8*(3), e58918.

[153] **Huang, D., Liu, J. & Shen, G.** (2009). Cloning, expression, and enzymatic characterization of isocitrate dehydrogenase from Helicobacter pylori. *Protein Journal*, *28*(9-10), 443-447.

[154] **Nelson, D. L.** (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. Fourth edition. New York : W.H. Freeman, 2005.

[155] **Sajnani, K., Islam, F., Smith, R. A., Gopalan, V. & Lam, A. K.** (2017). Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. *Biochimie*, *135*, 164-172.

[156] **Ternette, N., Yang, M., Laroyia, M., Kitagawa, M., O'Flaherty, L., … & Wolhulter, K.** (2013). Inhibition of mitochondrial aconitase by succination in fumarate hydratase deficiency. *Cell Reports*, *3*(3), 689-700.

[157] **Singh, K. K., Desouki, M. M., Franklin, R. B. & Costello, L. C.** (2006). Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues. *Molecular Cancer*, *5*, 14.

[158] **Wang, P., Mai, C., Wei, Y. L., Zhao, J. J., Hu, Y. M., … & Zeng, Z. L.** (2013). Decreased expression of the mitochondrial metabolic enzyme aconitase (ACO2) is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Medical Oncology*, *30*(2), 552.

EKLER

EK A: Denklemler.....119

EK B: Hastane izin belgesi…….....…….…….…...….121

Ek C: Girişimsel Olmayan Etik Kurul Onay Belgesi..…….....…….....…122

EK A

Denklem 2.1: Lambert Beer Denklemi:

$$I = I_0 \times 10^{-abc}$$

Denklem 2.2: Matematiksel düzenlenmiş Lamber- Beer Denklemi:

$$\frac{\Delta A/_{dk} \times Total\ Volüm\ (ml) \times 10^6}{\varepsilon \times Işık\ yolu \times Numune\ Volümü\ (ml)}$$

Denklem 3.1: Michaelis-Menten Denklemi

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Denklem 3.2: Lineweaver-Burk denklemine göre:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Denklem 3.3: Lambert-Berr Denklemi:

$$A = \varepsilon.d.c$$

Denklem 3.4: Enzim kinetik okuma formülü

$$V_0(IU) = \frac{\Delta A/_{dk} \times T.V.(ml) \times 10^6}{\varepsilon \times d \times N.V.(ml)}$$

Denklem 3.5: Kabul edilebilir kesinlik hesaplama formülü:

$$CV_A = (CV_E^* - 0.25)^{0,5}$$

Denklem 3.6: Ölçüm içi CV hesaplama formülü:

$$CV\ (\%)_W = \frac{\sqrt{MS_2}}{\bar{x}} \times 100$$

Denklem 3.7: Ölçümler arası CV hesaplama formülü:

$$CV(\%)_B = \frac{\left(\frac{(MS_1 - MS_2)}{n_0}\right)^{0,5}}{\bar{x}} \times 100$$

Denklem 3.8: Laboratuvar içi CV hesaplama formülü:

$$CV(\%)_{WL} = \frac{(V_W + V_B)^{0.5}}{\bar{x}} \times 100$$

Denklem 3.9: Kör limiti hesaplama denklemi:

$$LoB = ortalama + 1.645 \times SD$$

Denklem 3.10: En düşük ölçülebilir analit seviyesi hesaplama denklemi:

$$LoD = LoB + c_p \times SD$$

Denklem 3.11: LoD hesaplamasında düzeltme faktörü (c_p) hesaplama denklemi:

$$c_p = \frac{1.645}{1\frac{1}{4(L-j)}}$$

Denklem 3.12: Kesinlik ve doğruluğu değerlendirilebilen en düşük analit limiti hesaplama denklemi:

$$LoQ = LoD + 10\,SD$$

EK B

Evrak Tarih ve Sayısı: 03/09/2018-5224

BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi

Sayı : 97706721-900-
Konu : Etik Kurul

İLGİLİ MAKAMA

İlgi : Prof. Dr. Şahabettin SELEK'in, 28.08.2018 tarihli dilekçesi.

Prof. Dr. Şahabettin SELEK'in ilgi dilekçesi gereğince, "Tam Otomatik İzositrat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Kitinin Geliştirilmesi ve İzositrat Dehidrogenaz Enziminin Rekombinant Üretimi" isimli çalışmayı Hastanemiz Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda uygulama istemi Etik Kurul onayı ile beraber başvurması halinde Tıbbi Direktörlüğümüzce uygun bulunmuştur.

Gereğini bilgilerinize arz ve rica ederim.

e-imzalıdır
Prof.Dr. Fadlullah AKSOY
Hastane Tıbbi Direktörü

Mevcut Elektronik İmzalar
Mehmet Fadlullah Aksoy - Hastane Tıbbi Direktörü

Evrakı Doğrulamak İçin : https://ebys.bezmialem.edu.tr/enVision/Dogrula/NF354VH

Adres:Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Fatih / İstanbul
Telefon:0 (212) 453 17 00 - 4949 Faks0 (212) 453 18 79
e-Posta:info@bezmialem.edu.tr Elektronik Ağ:www.bezmialemhastanesi.com
Bilgi için: Esma ARAÇ
Unvanı: Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK C

Evrak Tarih ve Sayısı: 22/10/2018-16075

T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 54022451-050.05.04-
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Prof.Dr. Şahbettin SELEK

16.10.2018 tarihinde yapılan Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında "Tam Otomatik İzositrat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Kitinin Geliştirilmesi ve İzositrat Dehidrogenaz Enziminin Rekombinant Üretimi" başlıklı başvurunuz değerlendirilmiş olup karar yazısı ektedir.
Bilgilerinize.

e-imzalıdır
Prof.Dr. İsmail MERAL
Başkan

Ek: Karar Yazısı (2 sayfa)

22/10/2018 Sek. Elif Gamze ASLAN

Adres:Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Fatih / İstanbul
Telefon:0 (212) 523 22 88 Faks0 (212) 533 23 26
e-Posta:info@bezmialem.edu.tr Elektronik Ağ:www.bezmialem.edu.tr
Bilgi için: Elif Gamze ASLAN
Unvanı: Sekreter

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyad **:** Fatmanur KÖKTAŞOĞLU

Doğum Tarihi Yeri **:**

e-posta **:**

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:** 2006 – 2012, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi
- **Doktora** **:** 2016 – halen, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya

MESLEKİ DENEYİMLER:

- 2012 – 2013 yılları arasında Şanlıurfa Bozova İlçe Sağlık Müdürlüğüne bağlı aile hekimi olarak çalıştı.
- 2015 – 2016 yılları arasında İstanbul Kartal İlçe Sağlık Müdürlüğünde evde sağlık hekimi olarak görev yaptı.
- 2016 yılından beri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

YAYINLAR:

Ozer, O. F., Akbulut, H., Guler, E. M., Caglar, H. G., Gevher, F., Koktasoglu, F., Selek, S. (2019). Oxidative stress and phenotype frequencies of paraoxonase-1 in teratozoospermia. *Andrologia.* Sep;51(8):e13299. doi: 10.1111/and.13299. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31012132.

Caglar, H. G., Selek, S., Koktasoglu, F., Koyuncu, I., Demirel, M., Sarikaya, A., Meydan, S. (2019). Effect of Camellia sinensis, Hypericum perforatum and Urtica dioica on kidney and liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Cellular and Molecular Biology*. Jun 30;65(5):79-86. PMID: 31304911.

Kocyigit, A., Aydogdu, G., Balkan, E., Yenigun, V.B., Guler, E.M., Bulut, H., Koktasoglu, F., Gören, A.C., Atayoglu, A.T. (2019). Quercus pyrenaica Honeydew Honey With High Phenolic Contents Cause DNA Damage, Apoptosis, and Cell Death Through Generation of Reactive Oxygen Species in Gastric Adenocarcinoma Cells. *Integrative Cancer Therapies.* Jan-Dec;18:1534735419876334. doi: 10.1177/1534735419876334. PMID: 31556752; PMCID: PMC6764044.

Baki, A., **Özer, Ö. F.,** , **Yildiz, M.,**, **Köktaşoğlu, F.** (2020) Serum Melatonin Levels in Patients with Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Bezmialem Science.* 8(3):269-274.