

TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI

2024

1. U*** S***** Nükleer Manyetik Rezonans ve Kütle Spektroskopisi İle Biotinidaz Enzim Aktivite Ölçüm Yönteminin Geliştirilmesi
2. E*** B***** Krisinin İmmünmodulator Etki Yoluyla Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Olan Anti-Tümör Etkisinin Araştırılması

NÜKLEER MANYETİK REZONANS VE KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ İLE BİYOTİNİDAZ ENZİM AKTİVİTE ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Biyotinidaz (BTD) (EC 3.5.1.12), glikoprotein yapısında yaklaşık 80 kDa ağırlığında karaciğer ve beyin başta olmak üzere birçok dokuda bulunan bir enzimdir. Biyotinidaz enzimi diyetle alınan biyotinil peptitlerden ve biyositinden biyotin vitaminini kopararak serbest bırakır. Bu sayede karboksilaz enzimlerinin kofaktörü olan serbest biyotin sağlanmış olur. Otozomal resesif geçişli bir rahatsızlık olan biyotinidaz eksikliği serbest biyotin döngüsünün bozulmasıyla karakterizedir. Şayet biyotinidaz eksikliğine bağlı olarak metabolizmada serbest biyotin sağlanamaz ise biyotin bağımlı karboksilazlarda (asetil CoA karboksilaz, propiyonil CoA karboksilaz, pirüvat karboksilaz, β -metilkrotonil CoA karboksilaz) aktivite kaybı olur. Bunun sonucunda aminoasit katabolizması, glukoneojenez ve yağ asit sentezi gibi önemli metabolik yollarda homeostaz bozulur ve başta nörolojik bozukluklar olmak üzere gelişme gerilikleri, deri hastalıkları gibi birçok hastalık gelişir.

Doğal substratı biyositin ve biyotinilpeptidler olan biyotinidaz biyotin ile farklı moleküller arasındaki amid bağlarını parçalayabilir. Biyotinidazın bu özelliğinden faydalanarak enzim aktivitesini ölçmek için Biyotinil-p-aminobenzoat (B-PABA) ve biyotinil-6-aminokinolin gibi yapay substratlar geliştirilerek spektrofotometrik ve florometrik yöntemler ile enzim aktivitesi tespit yöntemleri geliştirilmiştir. Türkiye dahil dünyanın birçok ülkesinde yenidoğan tarama programlarında biyotinidaz enzim eksikliği tanısı için spektrofotometrik ve florometrik yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin dezavantajı yanlış sonuç verme oranlarının yüksek olmasıdır.

Teknolojinin gelişmesi ile birlikte Nükleer manyetik rezonans (NMR), Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) gibi yüksek hassasiyetli ileri teknoloji analiz cihazlarının laboratuvarlarda kullanılma oranı artmıştır. Bu tez çalışmasında NMR ve LC-MS/MS cihazlarını kullanarak yüksek hassasiyetli, düşük hata oranına sahip, tekrarlanabilir biyotinidaz enzim aktivitesi ölçüm metodu geliştirilmiştir. Çalışma esnasında yerli üretim Biyotinil Aminoantipirin (BAA) ve en sık kullanılan ticari B-PABA molekülleri substrat olarak kullanılmıştır. Biyotinidaz

enzim aktivitesi reaksiyon sonucu ortaya çıkan biyotin miktarının konsantrasyon artışının LC-MS/MS ve NMR cihazı ile tespitine dayanır. Bu bağlamda ilk olarak LC-MS/MS ile biyotine özel parmak izi niteliğinde olana ana ve fragman iyonlar belirlenmiştir. 5 dk lık bu metotta ana iyonun 245 m/z ve fragman iyonun ise 227 m/z biyotine karakterize pikler verdiği tespit edilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları neticesinde biyotinidaz enziminin 100 mM, pH 6 fosfat tamponu içerisinde, substrat varlığında 37 °C de en yüksek aktiviteyi verdiği belirlenmiştir. Oluşturulan yeni metotta BAA substratı ile istenilen seviyede aktivite alınamamıştır. Substrat olarak B-PABA nın kullanıldığı metotta önceden enzim aktivite değerlerini bildiğimiz numuneler ile korele sonuçlar elde edilmiştir. Metot validasyonu çalışması kapsamında iki farklı numunede 20 tekrarlı ölçüm çalışması sonucunda $Y=0,7818 C+0,0662$, ve korelasyon katsayısı $R^2=0.9877$ sonucuna ulaşılmıştır. Bir ay süren stabilite çalışmaları neticesinde +4 °C de bekletilen numunelerde aktivite kaybının %15, ve- 20 °C de bekletilen numunelerde ise kaybın sadece %5 olduğu belirlendi. 25 numuneden 3 tekrar ile yapılan ölçüm ve raporlama değerleri çalışması sonucunda standart sapmanın 0.094, Kantitasyon sınırı (LOQ) 0.939 ve Tespit sınırı (LOD) 0.282 IU olduğu belirlenmiştir.

Geliştirilen bu yeni LC-MS/MS yöntem ile halen uygulamada olan birçok biyotinidaz aktivitesi ölçüm metodundan daha hassas, daha kesin sonuçlar alınabilmektedir. Protein çöktürme işlemi gerçekleştirildikten sonra bu yöntem kullanılarak sadece 5 dk içinde hızlı ve güvenilir sonuç alınabilir. Talep edildiğinde, uygun saklama koşullarında muhafaza edilen örneklerin 30 gün sonra dahi tekrar hassas ölçümlerini elde etmek mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Biyotinidaz, LC-MS/MS, NMR, Biyotininil Aminoantipirin, B-PABA

**DEVELOPMENT OF BIOTINIDAZE ENZYME ACTIVITY
MEASUREMENT METHOD BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE
AND MASS SPECTROSCOPY**

SUMMARY

Biotinidase (EC 3.5.1.12) is an enzyme with a glycoprotein structure, weighing approximately 80 kD, and is found in many tissues, especially the liver and brain. The main function of the biotinidase enzyme is to cleave and release vitamin biotin from dietary biotinyl peptide sources. In this way, free biotin, which is the cofactor of carboxylase enzymes, is provided to the system. Biotinidase deficiency, an autosomal recessive disorder, is characterized by disruption of the free biotin cycle. If free biotin cannot be provided in metabolism due to biotinidase deficiency, there is a loss of activity in biotin-dependent carboxylases (acetyl CoA carboxylase, propionyl CoA carboxylase, pyruvate carboxylase, β -methylcrotonyl CoA carboxylase). As a result, homeostasis is disrupted in important metabolic pathways such as amino acid catabolism, gluconeogenesis and fatty acid synthesis, and many diseases such as neurological disorders, developmental delays and skin diseases develop.

Biotinidase, whose natural substrate is biotinylpeptides, can cleave the amide bonds between biotin and different molecules attached to it. Artificial substrates such as B-PABA and biotinyl-6-aminoquinoline have been developed to measure enzyme activity by taking advantage of this feature of biotinidase. Enzyme activity measurement methods have been developed using the spectrophotometric and fluorometric properties of these substrates. Diagnosis of biotinidase enzyme deficiency is still made using these methods in the newborn screening programs of many countries of the world, including Turkey. Unfortunately, the rate of incorrect results with the mentioned methods is very high.

With the development of technology, the use of high-precision advanced technology analysis devices such as NMR and LC-MS/MS in laboratories has increased. In this thesis study, a highly sensitive, low error rate, reproducible biotinidase enzyme activity measurement method was developed using NMR and LC-MS/MS devices. During the study, domestically produced Biotinyl Aminoantipyrine (BAA) and the most commonly used commercial B-PABA molecules were used as substrates. LC-MS/MS

and NMR biotinidase activity measurement method is based on the determination of the amount of biotin increased as a result of the enzyme reaction. In this context, firstly, main and fragment ions, which are biotin-specific fingerprints, were determined by LC-MS/MS. In this 5-minute method, signals characterizing biotin were detected for the main ion at 245 m/z and the fragment ion at 227 m/z.

As a result of optimization studies, it was determined that biotinidase enzyme reached its highest activity in the presence of substrate, at 37 °C and in 100 mM, pH 6 phosphate buffer. In the new method, the desired level of activity could not be obtained using the BAA substrate. It was determined that the method using B-PABA as the substrate was correlated with the results obtained from external laboratories. Within the scope of the method validation study, as a result of 20 repeated measurements on two different samples, $Y=0.7818 C+0.0662$ and correlation coefficient $R^2=0.9877$ were obtained. As a result of stability studies lasting one month, it was determined that the loss of activity was 15% in samples kept at +4 °C, and the loss was only 5% in samples kept at -20 °C. Measurement and evaluation experiments performed with 3 repetitions from 25 samples showed standard deviation: 0.094, LOQ: 0.939 and LOD: 0.282 IU.

With this new LC-MS/MS method, more sensitive and precise results can be obtained than many biotinidase activity measurement methods currently in practice. After the protein precipitation process is completed, results can be obtained in just 5 minutes using this method. If desired, precise measurements can be obtained again even after a month from samples stored under appropriate storage conditions.

Keywords: Biotinidase, LC-MS/MS, NMR, Biotinyl Aminoantipyrine, B-PABA

KRİSİNİN İMMÜNMODULATÖR ETKİ YOLUYLA MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ANTI-TÜMÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Krisin (5,7-dihidroksiflavon), doğal olarak bitki ve arı ürünlerinde bulunan bir flavonoiddir ve önemli biyolojik aktiviteleriyle, özellikle de anti-kanser etkileriyle bilinir. Faydalı özellikleri kısmen bağışıklık hücrelerini aktive etme yeteneğine atfedilmiştir. Bu çalışmanın ilk amacı; krisinin doğal öldürücü (NK) NK-92 hücreleri, Jurkat T hücreleri ve RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin aktivitelerini ve bu hücrelerin MCF-7 ve MDA-MB-231 gibi iki farklı tipte meme kanseri hücre hattına karşı olan anti-tümöral potansiyellerini nasıl değiştirdiğini araştırmaktır. İkinci olarak krisin etken maddesinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki immün kaçış mekanizmalarında önemli rol oynayan programlı hücre ölümü ligand-1 (PD-L1) protein ekspresyonuna ve yine kanser hücrelerinin hayatta kalım proteinlerinden olan p-akt ve p-mTOR protein ekspresyonları üzerindeki etkilerini değerlendirmektir.

İlk olarak, krisinin meme kanseri ve normal meme hücre hatlarındaki anti-proliferatif etkisi, reaktif oksijen türleri (ROS) üretim aktivitesi ve apoptotik etkisi sırasıyla MTT testi, DCF-DA floresan probu kullanılarak immünofloresan (IF) boyama ve akış sitometri testi, ve akridin oranj ve etidyum bromür (AO/EB) çift boyaması ile Annexin V/PI boyaması kullanılarak IF boyaması ve akış sitometri analizleri ile ölçüldü. NK-92, Jurkat T hücreleri ve RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin proliferasyonları WST-1 testi ile analiz edildi. NK-92 hücrelerinin etkinliği, IL-2 varlığında akış sitometri ile CD56⁺ yüzey protein ekspresyonunun analizi ve IFN- γ üretiminin enzim bağlı immünosorbent test (ELISA) ile spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle değerlendirildi. PHA-M ile indüklenen Jurkat T hücrelerinin aktivitesindeki değişiklik, ELISA yöntemiyle belirlendi. Makrofaj hücre hattında ise TNF- α ve nitrik oksit (NO) düzeylerinin ELISA ve Griess reaktifi ile ölçülmesiyle aktivasyon analizleri yapıldı. Krisin uygulanan NK-92 hücreleri doğrudan meme kanseri hücreleri ile birlikte kültüre edildi; meme kanseri hücrelerinin canlılığı MTT testi ile ölçüldü, süpernatantlardaki sitokinler ve granzim-B miktarları ELISA ile, NO miktarı ise Griess reaktifi ile ölçüldü. Krisine maruz bırakılmış meme kanseri hücreleri, PHA-M ile stimüle edilen Jurkat T hücreleri ile doğrudan ko-kültüre edildi; süpernatantlardaki sitokin düzeyleri ELISA testi ile belirlendi. Krisin uygulanan makrofaj hücrelerinin büyüme ortamları ile meme kanseri hücre süpernatantları birlikte kültüre edildi; meme kanseri hücrelerindeki apoptoz düzeyi AO/EB çift boyaması ve Aleksa-fluor-488 bağlı kaspaz-3 ölçümü IF yöntem ile gösterildi. PD-L1 protein düzeyleri EGF ile indüklenen meme kanseri hücrelerinde IF boyama ve western-blot yöntemleri ile analiz edildi. Yine meme kanseri hücrelerindeki p-akt ve p-MTOR protein ekspresyonları western-blot yöntemi ile değerlendirildi.

Krisin, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde artan intraselüler ROS üretimi ile sitotoksik ve apoptotik aktivite gösterdi. Ayrıca, NK-92 ve T hücrelerinin her iki meme kanseri hücre hattına karşı sitotoksitesini önemli ölçüde artırdı ve en belirgin etki MCF-7 hücrelerinde (%20) gözlemlendi. Bu sitotoksik etki IL-2 ve PHA-M varlığında daha da artarken, epidermal büyüme faktörü (EGF) ile tedavi edilen meme kanseri

hücrelerinde azaldı. NK-92 hücrelerinin meme kanseri hücre hatlarına karşı anti-tümöral yanıtı, granzim-B, TNF- α ve NO üretimindeki artışla ilişkili bulundu. Benzer şekilde, Jurkat T hücrelerinin meme kanseri hücre hatlarına karşı aktivasyonu, granzime-B, IL-2 ve IFN- γ üretimindeki artışla karakterize edildi. Makrofaj hücrelerinin anti-kanser yanıtı ise, meme kanseri hücrelerinde artan apoptoz ile ilişkilendirildi. Ayrıca, NK-92 hücrelerinin krisin ile uyarılması artmış IFN- γ üretimi ve CD56 ekspresyonu ile, Jurkat T hücrelerinin uyarılması IL-2 üretimi ile, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin uyarılması ise NO üretiminin artışıyla karakterize edildi. İki farklı meme kanseri hücre hattında EGF ile artan PD-L1 ve p-akt protein düzeyleri krisin ile inhibe olurken, p-mTOR protein ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmedi.

Bulgular, krisinin iki farklı meme kanseri hücre hattına karşı NK-92, T ve makrofaj hücrelerinin aktivasyonuna ve fonksiyonel artışına önemli ölçüde katkıda bulunduğunu, immün yanıtın kaçış mekanizmasında öneme sahip olan PD-L1 proteinini ve kanser progresyonunda rol oynayan p-akt düzeylerini azaltarak kanser tedavisinde hem terapötik hem de kanserin ilerlemesini önlemede kemo-preventif bir ajan olarak kullanılma potansiyelini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Krisin, NK hücresi, T hücresi, Makrofaj, Meme Kanseri, İmmün Kontrol Noktası Proteinleri

INVESTIGATION OF THE ANTI-TUMOR EFFECT OF CHRYSIN ON BREAST CANCER CELLS THROUGH IMMUNOMODULATORY ACTION

SUMMARY

Chrysin (5,7-dihydroxyflavone) is a flavonoid naturally found in plants and bee products, recognized for its significant biological activities, particularly its anti-cancer properties. These beneficial effects are partly attributed to its ability to activate immune cells. The primary aim of this study is to investigate how chrysin modulates the activities of natural killer (NK-92) cells, Jurkat T cells, and RAW 264.7 macrophages, and their anti-tumoral potentials against two different breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. The second objective is to assess the effects of chrysin on the expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1), a protein involved in immune evasion, as well as the expression of survival proteins p-Akt and p-mTOR in breast cancer cells.

Firstly, the anti-proliferative effects of chrysin on breast cancer and normal breast cell lines, its reactive oxygen species (ROS) production activity, and apoptotic effects were measured using MTT assay, DCF-DA fluorescent probe with immunofluorescence (IF) staining, flow cytometry, and acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double staining, as well as Annexin V/PI staining for IF staining and flow cytometry analyses. Proliferation of NK-92, Jurkat T cells, and RAW 264.7 macrophages was analyzed by WST-1 assay. The activity of NK-92 cells was evaluated through CD56⁺ surface protein expression analysis via flow cytometry in the presence of IL-2, and IFN- γ production was measured spectrophotometrically by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Changes in the activity of PHA-M-induced Jurkat T cells were determined by ELISA. Activation of the macrophage cell line was analyzed through measurements of TNF- α and nitric oxide (NO) levels using ELISA and Griess reagent. Chrysin-treated NK-92 cells were directly co-cultured with breast cancer cells; cancer cell viability was measured by MTT assay, and the amounts of cytokines and granzyme-B in supernatants were measured using ELISA, while NO levels were measured using Griess reagent. Chrysin-exposed breast cancer cells were co-cultured directly with PHA-M-stimulated Jurkat T cells; cytokine levels in the supernatants were determined by ELISA. Macrophage cells treated with chrysin were co-cultured with breast cancer cell supernatants; the apoptosis level in breast cancer cells was demonstrated using AO/EB double staining and Alexa-fluor-488-coupled caspase-3 measurement by IF method. PD-L1 protein levels in EGF-induced breast cancer cells were analyzed by IF staining and western blotting, while the expression of p-Akt and p-mTOR proteins in breast cancer cells was evaluated by western blotting.

Chrysin exhibited cytotoxic and apoptotic activity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells by increasing intracellular ROS production. Moreover, it significantly enhanced the cytotoxicity of NK-92 and T cells against both breast cancer cell lines, with the most prominent effect observed in MCF-7 cells (20%). This cytotoxic effect was further increased in the presence of IL-2 and PHA-M but decreased in EGF-treated breast cancer cells. The anti-tumoral response of NK-92 cells against breast cancer cell lines was associated with increased production of granzyme-B, TNF- α , and NO. Similarly, the activation of Jurkat T cells against breast cancer cell lines was characterized by increased production of granzyme-B, IL-2, and IFN- γ . The anti-cancer response of macrophage cells was related to increased apoptosis in breast cancer cells.

Furthermore, chrysin-stimulated NK-92 cells were characterized by increased IFN- γ production and CD56 expression, Jurkat T cells by increased IL-2 production, and RAW 264.7 macrophages by increased NO production. In two different breast cancer cell lines, the PD-L1 and p-Akt protein levels elevated by EGF were inhibited by chrysin, while no significant increase in p-mTOR protein expression was observed.

The findings suggest that chrysin significantly contributes to the activation and functional enhancement of NK-92, T, and macrophage cells against two different breast cancer cell lines. It also supports the potential use of chrysin as both a therapeutic and chemopreventive agent in cancer treatment by reducing PD-L1 and p-Akt levels, which play a role in cancer progression.

Keywords: Chrysin, NK cell, T cell, Macrophage, Breast Cancer, Immune Checkpoint Proteins