



EGE ÜNİVERSİTESİ



DOKTORA TEZİ

**İPEKBÖCEĞİ (*Bombyx mori* L.) SİNİR SİSTEMİNDE
YAŞLANMA SÜRECİNDE
ŞEKER DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Seçkin SOYA

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabire KARAÇALI

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi : 19.07.2013

Bornova-İZMİR

2013



EGE ÜNİVERSİTESİ



DOKTORA TEZİ

İPEKBÖCEĞİ (*Bombyx mori* L.) SİNİR SİSTEMİNDE

YAŞLANMA SÜRECİNDE

ŞEKER DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Seçkin SOYA

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabire KARAÇALI

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi : 19.07.2013

Bornova-İZMİR

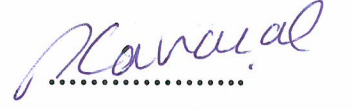
2013

Seçkin SOYA tarafından doktora tezi olarak sunulan “İPEKBÖCEĞİ (*Bombyx mori* L.) SİNİR SİSTEMİNDE YAŞLANMA SÜRECİNDE ŞEKER DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 19.07.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

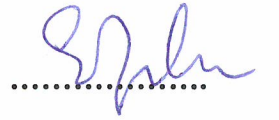
Jüri Başkanı : Prof. Dr. Sabire KARAÇALI


.....

Raportör Üye : Doç. Dr. Remziye DEVECİ


.....

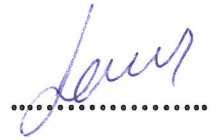
Üye : Doç. Dr. Erdal BALCAN


.....

Üye : Doç. Dr. Beyhan GÜRCÜ


.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU


.....

ÖZET

**İPEKBÖCEĞİ (*Bombyx mori* L.) SİNİR SİSTEMİNDE
YAŞLANMA SÜRECİNDE ŞEKER DEĞİŞİKLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

SOYA, Seçkin

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Sabire KARAÇALI

19 Temmuz 2013, 131 sayfa

Bu çalışmada, *Bombyx mori*'nin 3.(en genç) ve 5. (genç) evre larva, hareketsiz prepupa (yaşlı larva) ve pupa (ergine yapılanma) dönemlerine ait (1) beyin ve ip merdiven sinir sistemi dokularında yaşlanma sürecine bağlı olarak glukoz, mannoz, galaktoz, N-asetilglukozamin (GlcNAc), N-asetilgalaktozamin (GalNAc), fukoz, sialik asit (Neu5Ac), ksiloz, arabinoz ve riboz monosakkaritlerinin miktar değişiklikleri analitik bir teknik olan CapLC-ESI-MS/MS'le, (2) beyin doku örneklerinde ise; sialik asitin glikozidik bağ tipi değişiklikleri optik bir yöntem olan floresan mikroskopla, (3) beyin ve ip merdiven sinir sistemi dokularında protein ve glikoprotein miktar değişiklikleri ise SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir.

Monosakkarit belirlemeleri için metanol içinde homojenize edilen doku örneklerine glikokonjugatlardan monosakkaritlerin koparılması için asit hidroliz yöntemi uygulanmıştır. Sialik asit DMB ajanı ile, diğer monosakkaritler PMP ajanı ile türevlendirilmiş ve CapLC-ESI-MS/MS'le analiz edilmiştir. Glikan profilleri, glikokonjugatlar için özel olan monosakkaritlerin oranlarıyla hesaplanmıştır. Floresan mikroskop analizi için beyin doku örneklerine, FITC işaretli dört farklı lektin [LFA (*Limax flavus* aglutinin), MAA (*Maackia amurensis* aglutinin), SNA (*Sambucus nigra* aglutinin), PSL (*Polyporus squamosus* aglutinin)] uygulanmış ve floresan mikroskopla fotoğrafları çekilmiştir. SDS-PAGE yönteminde protein ve glikoprotein değişikliklerinin belirlenmesi poliakrilamid jellerin sırasıyla Coomassie mavisi ve Periyodik asit-Schiff ile boyanması ile gerçekleştirilmiştir.

Karşılaştırılan evrelerde en fazla bulunan monosakkarit glukozdur. Onu riboz şeker izlemektedir. Bütün monosakkaritler en fazla en genç (3.evre) dönemde bulunurken, yaşlanma sürecinde genel olarak azalmaktadır. Pupal evrede ise miktarlarında yeniden artışlar gözlenmiştir. Yaşlanma sürecinde en fazladan başlayarak monosakkaritlerde azalma sırasıyla ksiloz/arabinoz, galaktoz, riboz ve sialik asit, mannoz, fukoz ve N-asetilglukozamin şekerlerde görülmektedir. Proteoglikanlar, N- ve O-bağlı glikoproteinler ve polilaktozaminler genç örneklerde en fazla, yaşlı örneklerde en az bulunmaktadır. N- ve O-bağlı glikanları farklılaştıran fukoz şeker ile, oligosakkaritlerin son ucunda yer alan sialik asitler benzer şekilde genç ve yaşlı örneklerde sırasıyla en fazla ve azalarak bulunmuştur. Yaşlanmayla azalan N- ve O-glikanlarda azalmanın derecesi O-glikanlara göre N-glikanlarda daha büyük ölçüdedir. N-glikanların hibrit ve karmaşık tipleri en fazla en genç organizmada görülürken yüksek mannoz tip N-glikanlar ise en fazla pupa evresinde bulunurlar. Tüm sialik asitlere (LFA), N- ve O-glikanlarla polilaktozamin ve gangliositlerdeki Neu5Ac α 2,3Gal dizisine (MAA), Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc dizisine (SNA), N-glikan, polilaktozamin ve gangliositlerdeki Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc dizisine (PSL) özel olan fluoresan işaretli lektinlerle en fazla ışıma en genç beyinlerde görülmüştür. Genç evrelerde azalan ışıma yaşlı beyinlerde var-yok düzeyine düşmektedir. Pupal dönemde de ışımlar tekrar biraz artmaktadır. MAA ışımalarının bütün devrelerde en fazla olması α 2,3 bağlı sialik asitlerin bolluğunu işaret etmektedir. α 2,6 bağlı sialik asitler için en fazla ışıma en genç ve genç beyinlerde bulunmuştur. SDS-PAGE yöntemiyle protein içerikleri en yüksek yaşlı evre olan hareketsiz prepupada belirlenmiştir. Genç ve olgun evrelerden (3. ve 5.evre) yaşlı evreye (hareketsiz prepupal) doğru gidildikçe protein içeriklerinin kademeli olarak arttığı tespit edilmiştir. Fakat pupal dönemde protein miktarları yeniden düşük bulunmuştur. Periyodik asit-Schiff boyaması ile glikoproteinlerin değişimlerinin belirlenmesi analizleri, genç ve olgun evrelerde glikoproteinlerin az, yaşlanan bireylerde ise en bol bulunduğu göstermektedir.

Sonuç olarak; glikokonjugat tipleri için karakteristik olan monosakkaritlerin oranlarındaki değişiklikler, N- ve O-bağlı glikanlarla polilaktozaminlerin ve glikozaminoglikanların yaşlanma sürecinde azaldıklarını göstermektedir. α 2,3 ve α 2,6 bağlı sialik asitler de benzer şekilde azalmaktadır. Protein ve glikoproteinler

gittikçe artarak yaşlı larval sinir sisteminde en yüksek düzeye ulaşırken proteoglikanların glikozaminoglikanları ise tersine gittikçe azalarak en düşük düzeyde bulunmaktadır. İpekböceği sinir sistemindeki şeker değişikliklerinin yaşlanma sürecinde belirlendiği ilk çalışma olan bu doktora tezinin, yaşlanma mekanizmaları hakkında bilinenlere katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Monosakkaritler, Sialik asit bağ tipi, CapLC-ESI-MS/MS, FITC işaretli lektin, SDS-PAGE, Yaşlanma, *Bombyx mori* (İpekböceği)

ABSTRACT**DETERMINATION OF SUGAR CHANGES IN NERVOUS
SYSTEM OF SILKWORM (*Bombyx mori* L.)
DURING AGING**

SOYA, Seçkin

Ph.D. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sabire KARAÇALI

19th July, 2013, 131 pages

In this study, it is determined (1) by CapLC-ESI-MS/MS in order to find amount changes of glucose, mannose, galactose, N-acetylglucosamine (GlcNAc), N-acetylgalactosamine (GalNAc), fucose, sialic acid (Neu5Ac), xylose, arabinose and ribose monosaccharides in brain and ventral nerve cord tissues during aging process, (2) by fluorescent microscope in order to find changes of sialic acid glycosidic binding types in brain tissue samples, (3) by SDS-PAGE technique in order to find amount changes of proteins and glycoproteins among 3rd (the youngest) and 5th (young) larval instar, motionless prepupae (old larvae) and pupae (adult development) stages of *Bombyx mori*.

For monosaccharide determination, acid hydrolysis method was carried out for the samples, which were homogenized in methanol, in order to break monosaccharide linkages. Derivatization of sialic acid was performed with solution of DMB, and the other monosaccharides was derivatized with PMP agent and analyzed with CapLC-ESI-MS/MS. Glycan profiles were calculated by rates of monosaccharides which are specific for glycoconjugates. For fluorescent microscope analysis, brain tissue samples were treated with four FITC-labeled lectin [LFA (*Limax flavus* agglutinin), MAA (*Maackia amurensis* agglutinin), SNA (*Sambucus nigra* agglutinin), PSL (*Polyporus squamosus* agglutinin)] and then were photographed. In SDS-PAGE technique, determination of protein and glycoprotein changes was carried out with Coomassie Brilliant Blue and Periodic acid-Schiff staining, respectively.

In all stages, the most abundant monosaccharide is glucose. Second abundant is ribose. Although all monosaccharides are present mostly in the youngest stage (3rd instar), they generally reduce during aging process. In pupal stage, amounts of monosaccharides were observed as in increase. In aging process, if it is started with the most decreased ones, order of monosaccharides reduction seems like xylose/arabinose, galactose, ribose and sialic acid, mannose, fucose and N-acetylglucosamine, respectively. Proteoglycans, N- and O-linked glycoproteins and polylactosamines are mostly abundant in young samples, but poor in old samples. Fucose that differentiates N- and O-linked glycans and sialic acids that locate on terminal of oligosaccharides were found highest in young samples and reduced in old ones. N- and O-glycans decrease in aging process but reduction level is higher in N-glycans than in O-glycans. Although hybrid and complex types of N-glycans are highest in youngest samples, high mannose N-glycans are highest in pupal stage. The fluorescences were found the highest in youngest brain samples by application of FITC-labelled lectins which include LFA that is specific for all sialic acids, MAA that is specific for Neu5Ac α 2,3Gal sequence of N- and O-glycans, polylactosamine and gangliosides, SNA that is specific for Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc sequence, PSL that is specific for Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc sequence of N-glycans, polylactosamine and gangliosides. Fluorescences decrease in young samples and are almost nonexistent in old ones but increase somewhat in pupal stages. Excess of MAA fluorescences in all stages indicate that α 2,3 linked sialic acids are abundant. α 2,6 linked sialic acids are mostly present both in the youngest and young brain. Through SDS-PAGE technique, the protein contents are found highest in motionless prepupae which is old stage. From young and mature stages (3rd and 5th) to old stage (motionless prepupae), protein contents were found gradually in increase. During aging, protein contents were found as in increase, but they are found in decrease again in pupal stage. Periodic acid-Schiff staining indicates that glycoproteins are less in young and mature stages, but abundant in aged stage.

As a consequence, changes of monosaccharides ratios which are characteristic for glycoconjugate types indicate that N- and O-linked glycans, polylactosamines and glycosaminoglycans are in decrease in aging process. Similarly, α 2,3 and α 2,6 linked sialic acids are in decrease, too. Although proteins

and glycoproteins act cumulatively with the highest level in old larval nervous system, glycosaminoglycans of proteoglycans act in decrease and present in lowest level. It is thought that this PhD thesis, which is first demonstration of sugar content changes during aging process in silkworm nervous system, contributes to the knowledge about aging mechanisms.

Keywords: Monosaccharides, Sialic acid binding types, CapLC-ESI-MS/MS, FITC labelled lectin, SDS-PAGE, Aging, *Bombyx mori* (Silkworm)

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım boyunca destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Sabire KARAÇALI'ya, tez ve laboratuvar çalışmalarında deneyimleriyle bana yardımcı olan Doç. Dr. Remziye DEVECİ'ye, LC-MS çalışmalarını beraber yürüttüğümüz sevgili dostum Uzman Umut ŞAHAR'a, lektin işaretleme ve laboratuvar çalışmalarında bana her türlü desteği veren ve abiliğini her zaman yanımda hissettiğim Dr. M.Salih YIKILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma arkadaşlarım ve meslektaşlarım başta Yrd. Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU olmak üzere, Hüseyin ÖZAYDIN ve Merve AÇIKEL'e çalışma ortamımda bana her zaman yardımcı ve destek oldukları için çok teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan ve bütün dertlerimi sıkıntılarımı dinleyen ve destek olan Elif ELVERMEZ YILMAZ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca ipekböceği yumurtalarının temininde yardımcı olan Bursa Kozabirlik (S.S. Bursa Koza Tarım Satış Kooperatifleri Birliği)'e çok teşekkür ederim.

Son olarak benim bu duruma gelmemi sağlayan; hastalığımda, sağlığımda dertlerimde, sevinçlerimde her zaman yanımda olan, bana destek olan ve yaşam sevincimin kaynağı sevgili Babam, Annem ve Ablama sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

İyi ki varsınız.

Seçkin SOYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	viii
TEŞEKKÜR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	4
2.1 İpekböceği Biyolojisi	4
2.1.1 İpekböceğinin yaşam döngüsü	4
2.2 Böceklerde N-Glikozilasyon	9
2.2.1 N-glikozilasyonda çekirdek yapının oluşumu	9
2.2.2 Böcek hücrelerinde N-glikan olgunlaşması	10
2.2.3 Böceklerde N-bağlı glikozilasyonun önemi	12
2.3 Böceklerde O-Glikozilasyon ve Önemi	15
2.4 Böceklerde Proteoglikanların Önemi	16
2.5 Karbohidratların Sinir Sistemindeki Önemi	19
2.5.1 Sialik asit	19
2.5.2 α -L-Fukoz	31
3. MATERYAL VE METOD	34
3.1 Çalışma Materyali	34

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.1 Çalışma materyalinin yetiştirilmesi	35
3.1.2 Sinir sisteminin diseksiyonu	37
3.2 Metod	38
3.2.1 CapLC-ESI-MS/MS analizi ile belirleme	38
3.2.2 FITC işaretli lektinlerle belirleme	43
3.2.3 SDS-PAGE yöntemiyle belirleme	46
4. BULGULAR	51
4.1 Monosakkaritlerin Belirlenmesi	51
4.1.1 CapLC-ESI-MS/MS sisteminde monosakkarit standartlarıyla belirleme	51
4.1.2 Monosakkaritlerin evrelere göre değişimi	54
4.1.3 N-bağlı ve O-bağlı glikoproteinlerle proteoglikanların evrelere göre değişimi	69
4.2 FITC-İşaretli Lektin Uygulamaları	76
4.2.1 FITC-işaretli lektinlerle sialik asit glikozidik bağlanmalarının belirlenmesi	76
4.3 SDS-PAGE yöntemi ile total protein ve glikoprotein yoğunluklarının belirlenmesi	84
4.3.1 Coomassie mavisi ile total proteinlerin gösterilmesi	84
4.3.2 Periyodik Asit-Schiff boyama ile total glikoproteinlerin gösterilmesi	85
5. TARTIŞMA	86
5.1. Monosakkarit Değişimleri	86

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5.2 Glikan Profili Değişimleri	88
5.3 Diğer Böceklerde Monosakkarit ve Glikan Profil Değişimleri	88
5.4 Omurgalılarda Glikan Profil Değişimleri	90
5.5 Glikoprotein Değişimleri	92
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	94
ÖZGEÇMİŞ	129

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İpekböceği Yaşam Döngüsü.....	6
2.2. İpekböceği Evreleri	7
2.3. Lepidopter Böceklerin Metamorfoz Sırasında Sinir Sistemi Değişiklikleri.....	9
2.4. N-Glikan Olgunlaşma Süreci	10
2.5. Böcek Hücrelerinde Bol Bulunan Glikan Yapıları	13
2.6. Glikozaminoglikanların Biyosentezi.....	18
2.7. Doğada Görülen Sialik Asit ve Türevleri.....	21
2.8. Sialik Asiti Modifiye Eden Grupların Biyolojik Önemi	27
2.9. MAG’a Bağlanan Gangliositlerin Yapıları	29
3.1. İpekböceği Evreleri.....	34
3.2. Larval İp Merdiven Sinir Sistemi.....	34
3.3. Larval İpekböceği Beyni	34
3.4. Yumurtadan Yeni Çıkmış İpekböceği Larvaları	35
3.5. Petri Kapları İçerisinde Yetiştirilen İpekböceği Larvaları	35
3.6. Büyük Plastik Kaplarda Yetiştirilen İpekböceği Larvaları	35
3.7. Koza Örme Kapları	36
3.8. Dut Ağacından Yaprak Toplarken	36
3.9. Diseksiyon İşlemi Yapılan Stereomikroskop Ve Parafin Kaplı Petri	37

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.10. CapESI-LC-MS/MS Analizi Uygulama Basamakları	39
3.11. Analizlerin Yapıldığı CapLC-ESI-MS/MS Sistemi	39
3.12. Homojenizasyonun Yapıldığı Homojenizatör	40
3.13. Solüsyonların Azotla Uçurma İşlemlerinin Yapıldığı Düzenek.....	40
3.14. Vakumlu Konsantratör	41
3.15. PMP ve Monosakkarit Reaksiyonu	42
3.16. Sialik Asit ve DMB Reaksiyonu	43
3.17. Kesit Alınan Ultramikrotom.....	45
3.18. Nemli Odacıklı Lam Taşıyıcısı.....	45
3.19. Bilgisayara Bağlı Mikroskop-Kamera-Motorize Stage Sistemi.....	46
3.20. Isı Kontrollü ve Bilgisayara Bağlı Spektrofotometre	47
3.21. Cam Kasetler	48
3.22. Standart PageRuler Plus Prestained Protein Markeri	49
3.23. Mini-Protean III Elektroforez Sistemi.....	49
3.24. DNR Jel Görüntüleme Cihazı.....	50
4.1. Standart Monosakkaritlerin LC-MS Kromatogramları	52
4.2. Standart Monosakkaritlerin LC-MS Spektrumları	53
4.3. 3. Larval Dönem Monosakkaritlerinin LC-MS Kromatogram ve Spektrumları	55
4.4. 5. Larval Dönem Monosakkaritlerinin LC-MS Kromatogram ve Spektrumları	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5. Hareketsiz Prepupal Dönem Monosakkaritlerinin LC-MS Kromatogram ve Spektrumları	57
4.6. Pupal Dönem Monosakkaritlerinin LC-MS Kromatogram ve Spektrumları	58
4.7. Bütün Monosakkaritlerin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği.....	59
4.8. Glukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği	60
4.9. Mannozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği	61
4.10. Galaktozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği.....	62
4.11. N-Asetilglukozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği	63
4.12. N-Asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği.....	64
4.13. Fukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği	65
4.14. Sialik Asitin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği	66
4.15. Ksiloz ve Arabinozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği	67
4.16. Ribozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği	68
4.17. GlcNAc ve GalNAc'ın Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği...	69
4.18. Mannoz ve N-asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği	70
4.19. Galaktoz ve Mannoz'un Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği	71
4.20. Mannoz ve N-asetilglukozamin'in Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği	72
4.21. Galaktoz ve Fukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği	73
4.22. FITC-İşaretli LFA Lektini Uygulaması	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.23. LFA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derece Grafiği.....	77
4.24. FITC-İşaretli MAA Lektini Uygulaması.....	79
4.25. MAA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derece Grafiği.....	79
4.26. FITC-İşaretli SNA Lektini Uygulaması	81
4.27. SNA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derece Grafiği	81
4.28. FITC-İşaretli PSL Lektini Uygulaması	83
4.29. PSL Lektininin Evrelere Göre Işıma Derece Grafiği	83
4.30. Total Proteinlerin SDS-PAGE Jelde Coomassie Mavisi Boyaması.....	84
4.31. Total Glikoproteinlerin SDS-PAGE Jelde Periyodik Asit-Schiff Boyaması	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Uygun Besleme Koşullarında İpekböceklerinin Uyku ve Yaş Süreleri.....	5
2.2. Genel olarak bulunan sialil-oligosakkarit yapıları	20
3.1. Sıcaklık-Rutubet Tablosu.....	36
3.2. Kullanılan Lektinler ve Tanıdıkları Bağ Tipleri	44
4.1. Bütün Monosakkaritlerin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları	59
4.2. Glukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları.....	60
4.3. Glukozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi.....	60
4.4. Mannozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları	61
4.5. Mannozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi.....	61
4.6. Galaktozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları.....	62
4.7. Galaktozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi	62
4.8. N-Asetilglukozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları.....	63
4.9. N-Asetilglukozaminin Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi	63
4.10. N-Asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları.....	64
4.11. N-Asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi	64
4.12. Fukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları	65
4.13. Fukozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi.....	65
4.14. Sialik Asit'in Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları.....	66
4.15. Sialik Asitin Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.16. Ksiloz ve Arabinozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları.....	67
4.17. Ksiloz ve Arabinozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi	67
4.18. Ribozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları.....	68
4.19. Ribozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi	68
4.20. GlcNAc ve GalNAc'ın Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oranı	69
4.21. Mannoz ve N-asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oranı.....	70
4.22. Galaktoz ve Mannoz'un Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oranı.....	71
4.23. Mannoz ve N-asetilglukozamin'in Evrelere Göre Mutlak Pik Alan Oranları.....	72
4.24. Galaktoz ve Fukoz'un Evrelere Göre Mutlak Pik Alan Oranları.....	73
4.25. N-ve O-Bağlı Glikanlar, Polilaktozamin Zincirleri ve Proteoglikanlarla Genel Glikoprotein İçeriğinin Evrelere Göre Dağılışı	75
4.26. LFA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derecesi	77
4.27. MAA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derecesi	79
4.28. SNA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derecesi.....	81
4.29. PSL Lektininin Evrelere Göre Işıma Derecesi.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
M	Molar
pH	Power of hydrogen
ppm	Parts per million
mg	Miligram
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
N	Normal
mM	Milimolar
g	Gravity
rpm	Revolutions per minute
v	Volume
dk	Dakika
mm	Milimetre
psi	Pounds per Square Inch
L	Litre
nm	Nanometre
kDa	kilodalton
V	Volt
m/z	Kütle/yük

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
APS	Amonyum persülfat
Ara	Arabinoz
Asn	Asparajin
Bm-N	Özel bir <i>Bombyx mori</i> hücre hattı
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CapLC-ESI-MS/MS	Capillary Liquid Chromatography – Electronic Sprey Ionization - Mass Spectrometry
CHO	Chinese hamster ovary hücresi
CMP	Sitidin monofosfat
DLO	Dolikole Bağlı Oligosakkarit
DMB	4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dol	Dolikol
Dol-P	Dolikol-Fosfat
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ER	Endoplazmik Retikulum
F	Fetuin
fdl	fused lobes geni
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fuc	Fukoz
FucT C3	α 1,3-fukoziltransferaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
FucT C6	α 1,6-fukoziltransferaz
FUT	Fukoziltransferaz
GAG	Glikozaminoglikan
Gal	Galaktoz
GalNAc	N-asetilgalaktozamin
GalT	Galaktoziltransferaz
GD1a	Disialotetrahexosylganglioside a
GDP	Guanozil Difosfat
Glc	Glukoz
GlcNAc	N-asetilglukozamin
GlcNAcT-I	N-asetilglukozaminiltransferaz I
GnT I	N-asetilglukozaminiltransferaz I
GnT II	N-asetilglukozaminiltransferaz II
GQ1b α	Cholinergic neuron-specific ganglioside 1b α
GT1b	Trisialotetrahexosylganglioside b
HCl	Hidroklorik Asit
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid
HM20	Lowicryl Türü
HPLC	High pressure liquid chromatography
Hpp	Hareketsiz Prepupa
KDN	Deaminonöraminik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
LAD II	Lökosit adezyon eksikliği tip II
LFA	<i>Limax flavus</i> aglutinin
MAA	<i>Maackia amurensis</i> aglutinin
MAG	Myelin bağlantılı glikoprotein
Man	Mannoz
Man-6-P	Mannoz-6-fosfat ()
Mb0503	Özel bir <i>Mamestra brassicae</i> hücre hattı
Mgat1	Mannoside acetylglucosaminyltransferase 1
MSS	Merkezi sinir sistemi
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCAM	Nöral hücre adezyon molekülü
Neu	Nöraminik asit
Neu5,9Ac2	N-asetil-9-O-asetilnöraminik asit
Neu5Ac	N-asetilnöraminikasit
Neu5Ac9P	N-asetilnöraminik asit-9-fosfat
Neu5Gc	N-glikolilnöraminik asit
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
O-FucT-1	O-fukoziltransferaz I
OGA	O-N-Asetilglukozaminidaz
OGT	O-N-Asetilglukozamin transferaz
Orig	Orijinal
OST	Oligosakkaril Transferaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
P.A	Paraformaldehit
P	Fosfat
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	Fosfat Buffer Salin
pgant35A	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 35A
PGANTs	UDP- <i>N</i> -asetilgalaktozamin:polipeptit <i>N</i> -asetilgalaktozaminiltransferazlar
PMP	1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone
POFUT1	Protein O-fukoziltransferaz 1
POMGnT1	Protein O-mannoz N-asetilglukozaminiltransferaz 1
POMT1	Protein O-mannosyl-transferase 1
POMT2	Protein O-mannosyl-transferase 2
ppGaNTaz	Poliipeptit N-asetilgalaktozaminiltransferaz
PSA	Polisialik asit
R.T	Room temperature
RNAi	Ribonükleik asit interferens
rt	rotated abdomen
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Serin
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> 21 hücreleri
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9 hücreleri
Sf-Man I	<i>Spodoptera frugiperda</i> hücrelerinin α -mannozidaz I enzimi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Sia	Sialik Asit
SiaT	Sialiltransferaz
SNA	<i>Sambucus nigra</i> aglutinin
Na ₂ O ₄ S ₂	Sodyum hidrosülfid
ST6Gal I	α2,6 sialiltransferaz I
ST6Gal II	α2,6 sialiltransferaz II
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifloroasetik asit
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü-β
Thr	Treonin
Tn Ag	Tn antijeni
Tn-5B1-4	Özel bir <i>Trichoplusia ni</i> hücre hattı
tw	twisted
U.A	Uranil Asetat
UDP	Uranozil Difosfat
UV	Ultraviole
wol	Wollknaue gen
Xyl	Ksiloz
β4GalT	β1,4-galaktoziltransferaz

1. GİRİŞ

Hücre yüzeyinde karmaşık bir dizi oligosakkarit, glikoprotein ve glikolipit üzerine bağlı bulunmaktadır. Bu çeşitli glikanlar hücre göçü, çoğalması, kopya çıkışında düzenleme ve farklılaşma gibi geniş çaptaki biyolojik olayları düzenleyen pek çok bilgi hazinesi içermektedir (Nishihira, 1998; Gabius et al., 2002; Becker and Lowe, 2003; Gama and Hsieh-Wilson 2005; Rampal et al., 2007). İnsan proteomunun % 50'sinden fazlasının glikozillenmiş olduğu düşünüldüğünde, glikozilasyon en sık görülen protein sentezi sonrası modifikasyonlardan biridir (Apweiler et al., 1999). Glikozilasyon hücrede bilgi iletimi karmaşıklığına yeni bir boyut katmakla birlikte, proteinlerin görevini düzenleme yeteneğini de geliştirmektedir. Glikan modifikasyonlarının yapısal karmaşıklığı, tek bir monosakkarit birimi eklenmesiyle oluşabildiği gibi, dallı ya da doğrusal dizileri oluşturacak şekilde yüzlerce şeker içeren polisakkaritlerin eklenmesiyle de oluşabilmektedir (Kleene and Schachner, 2004). Oluşan kimyasal çeşitlilik glikokonjugatlara yapısal kararlılık ve proteolitik korunmadan, protein tanıma ve hücre haberleşme ağlarının düzenlenmesine kadar bir dizi işlevler sağlar (Wells et al., 2001; Rudd et al., 2002; Yamaguchi, 2002; Wujek et al., 2004; Rexach et al., 2008). Tüm bu görevler az sayıdaki (glukoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, sialik asit ve ksiloz gibi) monomerik birimlerle gerçekleştirilir.

Ortaya çıkan deliller, sinir sistemi gelişimi ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde glikanların rol aldığını göstermektedir. Örneğin, glikozilasyonun akson uzantısı ve morfolojisi gibi çeşitli nöronal süreçleri etkilediği, öğrenme ve hafıza altında yatan moleküler olaylara katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Kleene and Schachner, 2004; Kalovidouris et al., 2005; Murrey et al., 2006). Glikozilasyon hücre sinyallemede etkin bir düzenleyicidir ve bellek yol izinde görev almaktadır (Sandi et al., 1995; Murphy and Regan, 1998; Welzl and Stork., 2003; Salinska et al., 2004). Glikozilasyon enzimlerinin genetik kusurları genellikle gelişim bozukluklarına yol açar ve stres ve biliş gibi çeşitli organizma davranışlarını etkileyebilmektedir (Muramatsu, 2000; Best et al., 2005; Stickens et al., 2005; Ohtsubo and Marth, 2006; Jaeken and Matthijs, 2007; Kudo et al., 2007).

Glikanların yapı-işlev ilişkilerinin anlaşılmasının diğer biyomoleküllerin gerisinde kalması, analizlerini kolaylaştırmak için gerekli araçların ve yöntemlerin eksikliği engel olmuştur. Nükleik asitlerin ve proteinlerin aksine, oligosakkaritler çoğu kez dallara ayrılmış yapılara sahiptir ve bunların biyosentezi şablona dayalı kodlamalar değildir. Bu nedenle, oligosakkaritlerin bileşim ve sıraları kolayca tahmin edilemez ve genetik manipülasyonlar önemli ölçüde daha zordur. Oligosakkaritlerin profillerinin, sıraları ve tersiyer yapılarının araştırılması için analitik teknikler hala geliştirilme aşamasındadır ve DNA ve protein analizi için olan yöntemlerin aksine, rutin kullanımdan uzaktırlar. Bununla birlikte, glikan yapıları doğrudan genetik kontrol altında değildir ve bu nedenle, sıklıkla heterojendir. Bu heterojenlik doğal kaynaklardan glikan izolasyonu ve saflaştırmasına dayanan geleneksel biyokimyasal yaklaşımlarla yapı ve fonksiyon analizlerini zorlaştırmaktadır.

Oligosakkarit analizi ile ilişkili sorunların oligosakkarit biyolojisinin anlaşılmasına yönelik çabaları engellemesinden dolayı, araştırmacılar bu zorlukların üstesinden gelmek için yeni yöntemler geliştirmeye çalışmaktadır. Glikan yapı ve fonksiyon analizleri için biyokimyasal yöntemler geliştirilmesi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde glikokonjugatların rollerinin anlaşılmasını çözmek için esastır.

Modern yaşamda ortalama ömür gittikçe uzamakla birlikte yaşam kalitesini artırmak toplum sağlığı için en önemsenen konulardan biridir. Araştırmacılar yaşlanmanın mekanizmasını anlamak ve bu süreci kontrol edebilmek için uğraşmakta ve bu amaçla pek çok teori ileri sürmektedir. Sekonder gen ürünleri olan glikokonjugatlardaki şeker içeriklerinin değişiklikleri bu teorilerden biridir. Bilim insanları karbohidratların gerçekleştirdiği moleküler olayları ise son yıllarda anlamaya başlamışlardır. Bu nedenle, karbohidratların molekül, hücre, doku ve organizma düzeyinde; biyolojik çeşitlilikten sorumlu olduklarının, bilgi geçişiyle haber iletiminin herhangi bir basamağında iş gördüklerinin, özel tanıma olaylarını idare ettiklerinin, biyolojik olayların değişmesini sağladıklarının, kısaca temel biyolojik görevlerinin keşfedilmesi yeni gelişmelerdir (Karaçalı ve ark., 2010).

Glikoproteinlerin (N- ve O-bağlı), glikolipitlerin ve proteoglikanların miktarları ve tipleri ile glikozilasyon profilleri ve düzenleyen mekanizmaları yaşılanma sürecinde farklılık göstermektedir. Hücre içi ve dışı pek çok görev üstlenen glikokonjugatların oligosakkarit profillerini oluşturan monosakkaritlerin yaşılanma olaylarındaki değışikliklerinin belirlenmesi bu sürecin daha iyi anlaşılabilmesi için iyi bir araç olacaktır. Bu amaçla aday bir model organizma olan ipekböceği (*Bombyx mori* L.)'nin yaşılanma ve metamorfoz (yeniden yapılanma) sürecinde morfolojik değışikliğe uğrayan sinir sistemi monosakkarit değışiklikleri analitik (CapLC-ESI-MS/MS), sialik asit bağ tipi değışiklikleri optik (Fluoresan mikroskopi) ve protein ve glikoprotein değışiklikleri elektroforetik (SDS-PAGE) yöntemlerle incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. İpekböceği Biyolojisi

İpekböcekleri arthropoda filumundan böcekler sınıfına dahildir. Böcekler sınıfı Apterygota ve Pterygota olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılır. *Bombyx mori* bunlardan Pterygota alt sınıfına girmektedir ve sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir;

Phylum: Arthropoda

Sub: Unilamia (tek çıkıntılılar)

Classis: Insecta

Sub: Pterygota

Infra: Neoptera

Super Ordo : Holometabola

Ordo: Lepidoptera

Sub: Ditrysia

Super Familya : Bombycoidea

Familya: Bombycidae

Genus: Bombyx

Species: mori

İpekböceklerinin de dahil olduğu tüm gece ve gündüz kelebekleri Lepidoptera ordosuna dahildir. Lepidoptera ordosuna mensup ipek üreten *Bombycidae* ve *Saturnidae* familyaları vardır. Bunlardan *Bombycidae* familyasına evcil olarak yetiştirilen *Bombyx mori* ve doğada yetiştirilen *Bombyx mandarina* türleri girmektedir (Parlak, 2001).

2.1.1. İpekböceğinin Yaşam Döngüsü

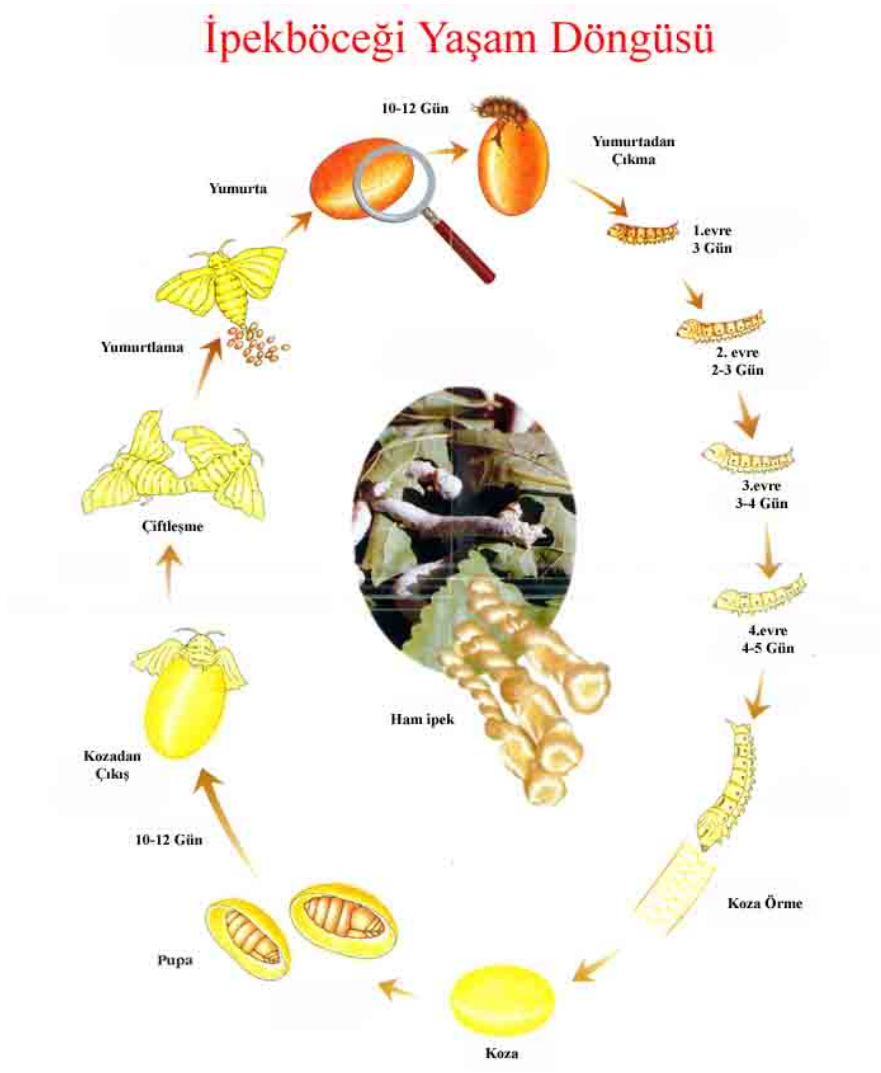
2.1.1.1. Larval Evreler

Holometabol böceklerden olan *Bombyx mori* larvalarının pupal ve ergin safhaları birbirinden tamamen farklı olup tam metamorfoz geçirir. Tüm Lepidopteralarda olduğu gibi yaşamları boyunca çeşitli evrelerden oluşan bir yaşam süreci geçirirler (Şekil 2.1). Bunlar, yumurta açılması ile başladıktan sonra,

larval evre, prepupal evre, pupal evre ve ergin dönemdir (Şekil 2.2). Bu yaşam süreleri toplam 6 ile 8 hafta sürebilmektedir. Yaşam periyodu; yumurtalar için 11-14, larvalar için 24-28, pupalar için 12-15, ergin için 6-10 gündür. İpekböceği yumurtaları ilkbaharda açılır ve larval evreden sonra ergin hale gelen ipekböcekleri yumurtalarını bırakarak ölürler. Diyapozlu olan bu yumurtaların açılmaları ise ertesi yıl ilkbaharda olur. İpekböcekleri larval yaşamları süresince 4 kez deri değiştirirler ve her deri değişimi onların biraz daha büyümelerini sağlar. Dört kez deri değiştiren *Bombyx* larvalarında beş larval evre ayırt edilmektedir (Çizelge 2.1). İlk üç evre genç larval yaş olarak adlandırılır, diğer iki evre ise olgunluk yaşı olarak bilinir (Parlak, 2001).

Çizelge 2.1. Uygun Besleme Koşullarında İpekböceklerinin Uyku ve Yaş Süreleri

Yaşlar	Yaş Süresi (Gün)	Uyku Süresi (Gün)	Toplam (Gün)
1	3	1	4
2	2.5	1	3.5
3	3	1.5	4.5
4	4	2	6
5	8	-	8
Toplam	20.5	5.5	26



Şekil 2.1. İpekböceği Yaşam Döngüsü

İpekböceklerinin ana besini taze dut yaprağıdır. İpekböceğinin her larval evresinde iki faz ayırt edilmektedir. Bunlar, larvaların beslenme fazı diğeri ise deri değiştirme fazıdır. Evre başlangıcında hızlı bir şekilde yaprak yemeyi takiben boyda da hızlı bir irileşme görülür. Her evre sonunda maksimum boya ulaşan larva deri değiştirme fazına girer. Yaprak yeme işlemini durdurur ve başını kaldırarak hareketsiz bekler. Daha sonra yeni evreye geçen larva bir diğerevreye kadar dut yaprağı yemeye devam eder. Larva her deri değiştirmede dış görünüşünde de bir değişikliğe uğramaktadır (Parlak, 2001).



Şekil 2.2. İpekböceği Evreleri (Orig.)

2.1.1.2. İpekböceğinin Prepupa Evresi

Koza içerisinde prepupal evreye girmiş ipekböceklerinin larval evredeki büyüklüklerine göre boyları oldukça kısalmış ve hareketsiz hale gelmiştir. Derinin yüzeyi kırışık bir görünüm almaktadır. Bu görünüş derinin bir süre sonra atılacağına belirgin işaretleridir. Prepupal evredeki larvalar üzerinden deri atıldıktan sonra açık sarı renkli pupal dönem başlar. Kısa süre sonra deri açık sarı renkten kahverengiye dönüşür (Parlak, 2001).

2.1.1.3. Pupal Evre

Küçük bir baş, toraks ve vücut üzerini kaplayan kahverengi bir kütikula örtüsü ile 9 segmentten oluşan tombul bir vücut yapısına sahiptir.

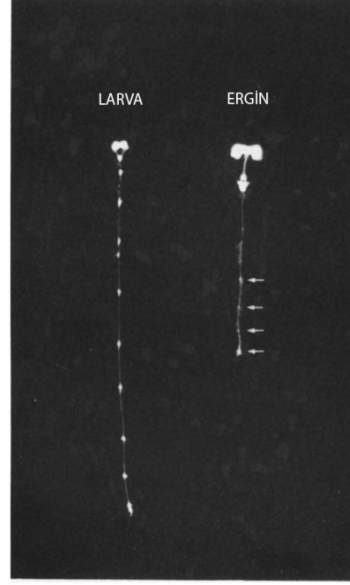
Kütikula, stomaların dışında bütün vücudu kaplar. Antenler kütikulanın dışında kalır. Ayak ve kanatlar ise kütikulanın altına gizlenmiş durumdadır. Koza içerisindeki pupa; görme yeteneğinden yoksun ve hareketsizdir. Sadece son segment oldukça az hareket yeteneğine sahiptir. Bu sayede pupanın altı üstüne değişebilir (Parlak, 2001).

2.1.1.4. İpekböceği Merkezi Sinir Sistemi

İpekböceklerinde merkezi sinir sistemi üç kısımdan oluşmaktadır. Bunlar, serebral ganglion, subösofagial ganglion ve ventral sinir şerididir (Şekil 2.3).

Bunlardan serebral ganglion, başta ösofagus'un hemen üzerindedir. Larval devrelerde iki loptan (protoserebrum ve deutoserebrum) erginde üç loptan (protoserebrum, deutoserebrum ve tritoserebrum) yapılmıştır. Buna merkezi ganglion denir. Ventral bölgedeki merkezi ganglion sub-ösofagial ganglion iki sinir ile beyne bağlıdır.

Böceklerde ventral ip merdiveni sinir sistemi iki seri gangliondan yapılmıştır. Fakat, her ganglion çifti kaynaşmış durumda olduğu için tek şekilli gibi görünür. Larval evrede ventral sinir kordonu abdomen ve toraks'ın ventraline bakan yüzeyde sindirim borusunun altında bir seri gangliondan oluşmaktadır. Bu ganglionlar beyinden sonra sub-ösofagial ganglionla başlar ve son segmente kadar uzanan zincir şeklindedir. Toraksta herbiri bir segmentte yer alan üç ganglion mevcuttur. Abdomende ise sekiz ganglion mevcuttur ve bunlardan herbiri bir segmentte bulunur. Torakstaki her ganglion iki çift sinir demetine sahiptir. İpekböceklerinde, serebral ganglion ve sub-ösofagial ganglion ösofagusu halka şeklinde çeviren bir yapı haline dönüşmüştür. Ergin beyinde optik loplar tek parça halinde ve başta büyük yer işgal etmektedir. Oysa larval dönemde gelişmiş bir optik lop bulunmamaktadır. Fakat beyinle bağlantılı olan iki uzun sinir taşımaktadır. Larval evreye göre ergin ipekböcekleri dorsal merkezi ganglion ile ventral sinir ganglionlarında bazı değişiklikler meydana gelir. Larvalarda bulunan on iki adet ventral sinir ganglionu erginlerde sekiz adete inmiştir. Erginlerde 2. ve 3. toraks segmentleri kanatlara uzanan üçüncü sinir çiftini taşımaktadır ki bunlar da hayvanın hareketini yönlendirmektedir. Ergin böceğin ventral sinir kordonu birbirine çok yakın üç torasik gangliondan (protoraks, mesotoraks, metatoraks) ve dört adet abdominal gangliondan oluşmaktadır. Sonuncu abdominal segmente ait ganglion karmaşık bir yapı gösterir (Parlak, 2001).



Şekil 2.3. Lepidopter Böceklerin Metamorfoz Sırasında Sinir Sistemi Değişiklikleri. (Tsujimura, 1983'den uyarlanmıştır)

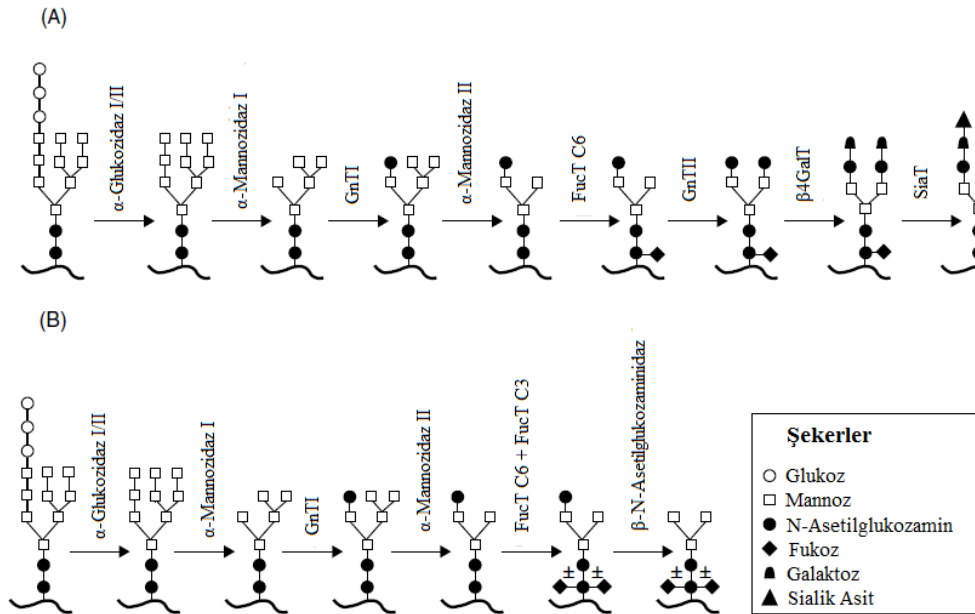
2.2. Böceklerde N-Glikozilasyon

2.2.1. N-Glikozilasyonda Çekirdek Yapının Oluşumu

Böceklerdeki glikozilasyonla ilgili ilk çalışmalar, *Drosophila* ve sivrisinek üzerine yapılmıştır (Hsieh and Robbins, 1984). Böceklerdeki glikozilasyonun başlangıç basamakları memeli hücrelerindeki ile benzer bulunmuş olsa da, böceklerde daha sonraki modifikasyonlar farklıdır ve elde edilen glikanlar memelilerdeki kadar karmaşık değildir (Butters and Hughes, 1981; Hsieh and Robbins, 1984; Parker et al., 1991). Baculovirüs teknolojisinin gelişmesi ile, çok daha fazla böcek hücre kültürü geliştirilmiş ve bu baculovirüse uygun hücre hatlarının glikozilasyon potansiyeli çalışılmıştır. Bu bilgi, böcek hücrelerindeki mevcut farklı glikozilasyon aktivitelerinin anlaşılabilmesi için çok fazla yarar sağlamış ve böcek hücre hatları glikozilasyon potansiyelleri arasında benzerlik ve farklılıkların ortaya konulmasını sağlamıştır.

Böcek ve memeli hücrelerinde N-glikozilasyon bir verici dolikol molekülünden bir $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosakkaritinin yeni oluşan glikoproteinin alıcı sırasındaki (-Asn-X-Ser/Thr-) asparajin aminoasidine nakledilmesi ile başlar. Böceklerde dolikole bağlı oligosakkaritin (DLO) sentezi memelilerdeki ile aynıdır (Sagami and Lennarz, 1987). İlk olarak, iki N-asetilglukozamin (GlcNAc)

kalıntısı $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ yapısını oluşturmak için, daha sonra beş mannoz (Man) kalıntısı $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ oluşturmak için eklenir. Bu eklenme için verici moleküller sırasıyla UDP-GlcNAc ve GDP-Man'dur ve bu eklenme endoplazmik retikulum (ER) zarının sitoplazmik tarafında gerçekleşir. Daha sonra, dolikole bağlı $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ yapısı ER lümeni içine döner ve daha sonraki monosakkarit eklenmeleri ER lümeninde gerçekleşir. Dört Man ve üç glukoz kalıntısı DLO'ya verici moleküller olan dolikol-fosfat-glukoz (Dol-P-Glc) ve dolikol-fosfat-mannozla (Dol-P-Man) eklenir. Dol-P'ye bağlı $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosakkariti endoplazmik retikulumda yeni oluşan polipeptite oligosakkaril transferaz (OST) enzimi ile geçirilir. Bundan sonra, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosakkariti ER ve golgi bölgelerinde bulunan çok sayıdaki enzimlerle sırasıyla kesilir. Böcek ve memeli hücrelerinde üretilen son glikan yapıları arasındaki farklılıklar kesilmelerindeki farklılıklardan ve $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosakkaritinin daha sonraki değişikliklerinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. N-Glikan Olgunlaşma Süreci, (A) Memeli Hücreleri (B) Böcek Hücreleri (Wisvanathan and Betenbaugh, 2005'den uyarlanmıştır)

2.2.2. Böcek Hücrelerinde N-Glikan Olgunlaşması

Çeşitli lepidopter böcek hücrelerinde N-glikan analizleri gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar temel olarak yüksek mannoz ve az sayıda mannoz içeren

(pausimannozidik) glikan yapılarının bulunduğunu göstermiştir. Bu yapıların varlığı, α 1,2-glukozidaz I, α 1,3-glukozidaz II, ve α 1,2-mannozidaz gibi enzimlerin bulunduğunu göstermektedir. Gerçekten de glikozidaz engelleyicileri ile yapılan araştırmalarla, böcek hücrelerinde α -glukozidaz I, II, ve α -mannozidaz enzimlerinin bulunduğu kanıtlanmıştır (Davis et al., 1993). Bununla birlikte, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, ve $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 'yi substrat olarak kullanan α -mannozidaz I, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 'yi oluşturmaktadır (Ren et al., 1995). Bu enzimin aminoasit sırası bütün bilinen üç insan golgi α -mannozidazları IA, IB, and IC ile homoloji göstermekte ve insan α 1,2-mannozidaz IC ile benzer substrat seçiciliği göstermektedir (Tremblay and Herscovics, 2000).

Memeli glikan olgunlaşmasındaki bir sonraki basamak, GlcNAc kalıntısının $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 'nin Man- α 1,3 dalına *N*-asetilglukozaminiltransferaz I (GnT I) aktivitesi ile eklenmesidir. GnTI *Drosophila*'dan klonlanmıştır (Sarkar and Schachter, 2001) ve aktivitesi Sf9, Sf21, Mb0503, and Bm-N gibi çeşitli böcek hücre hatlarında incelenmiştir (Altmann et al., 1993; Velardo et al., 1993). GlcNAc'in Man- α 1,3 dalına eklenmesinin ardından, glikan $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ α -mannozidaz II etkisiyle α 1,3Man ve α 1,6Man uzaklaştırılır. α -mannozidaz II aktivitesi ayrıca Sf21, Mb0503, ve Bm-N hücrelerinde tespit edilmiştir (Altmann and Marz, 1995). Memeli enzimine benzer şekilde, GlcNAc'in Man- α 1,3 dalındaki varlığının bu mannozidaz aktivitesi için gerekli olduğu bulunmuştur (Altmann and Marz, 1995).

Memeli hücrelerinde asparajine bağlı GlcNAc'e çekirdek α 1,6-fukoziltransferaz (FucT C6) ile bir α 1,6-bağlı fukoz bağlanması N-glikanları değiştirir. Bu FucT C6 aktivitesine ek olarak, bazı böcek hücrelerinde memeli hücrelerinde olmayan bir çekirdek α 1,3-fukoziltransferaz (FucT C3) daha bulunur (Staudacher and Marz, 1998). Asparajine bağlı GlcNAc'e bağlı $\text{Fuc}\alpha$ 1,6 ve bir $\text{Fuc}\alpha$ 1,3'e sahip N-glikanlar Mb0503, Sf21, ve Bm-N hücrelerinin zar glikoproteinlerinde belirlenmiştir. En içteki GlcNAc'e tutunmuş bir α 1,3-bağlı fukoz varlığı, insanlarda alerjik reaksiyonlara neden olabilen potansiyel bir epitopun oluşumunu akla getirmektedir (Prenner et al., 1992; Wilson et al., 1998; Hemmer et al., 2001; Wilson et al., 2001; Bencurova et al., 2004).

Memeli hücrelerinde α -mannozidaz II işlenmesi ve FucT C6 aktivitesini sonucu oluşan GlcNAcMan₅GlcNAc₂[$\pm$ Fuc α 1,6] yapısı GnT II için bir substrat görevi görmekte ve iki antenli yapıların oluşumunu başlatmaktadır. Memeli hücrelerindeki farklı olarak, böcek hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda yetersiz GnT II aktivitesi bulunmuştur. Sf9, Sf21, Mb0503, ve Bm-N hücrelerinde, GnT II aktivitesi memeli hücrelerinin %1'inden daha az bulunmuştur (Altmann et al., 1993). *Drosophila* genomunda bir GnT II homologu tespit edilmiştir fakat fonksiyonel genin ifadesi pek çok böcek hücre hattı için sınırlıdır (Fabini et al., 2001; Schachter, 2002).

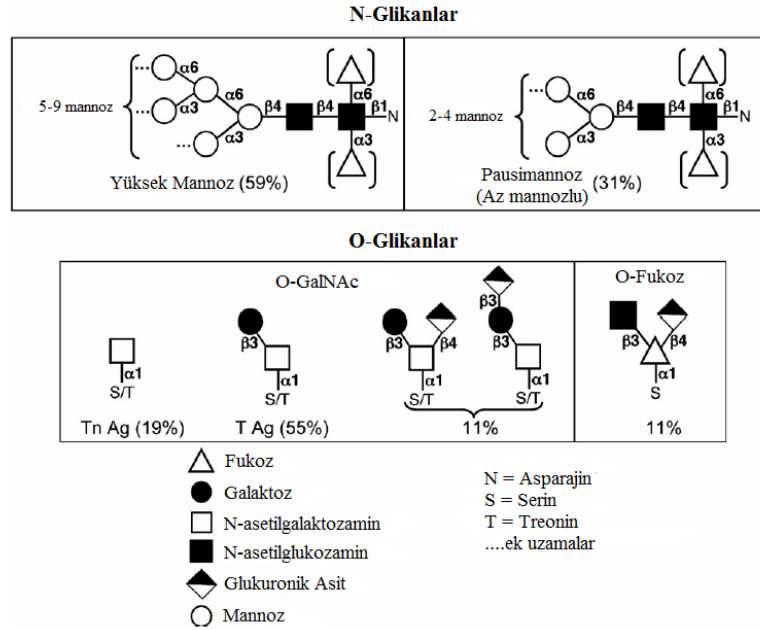
Memeli hücrelerinde, GlcNAc ile sonlanan glikanlar tipik olarak β 1,4-Gal eklenmesi için β 1,4-galaktoziltransferaza (β 4GalT) substrat görevi görmektedir. Bununla birlikte, Sf9, Tn-5B1-4, ve Mb0503 hücrelerindeki ölçümler, β 4GalT aktivitesinin az bulunduğunu göstermektedir (van Die et al., 1996; Hollister et al., 1998; Hollister et al., 2001). Tn-5B1-4 hücrelerinde β 4GalT aktivitesinin Chinese hamster ovary (CHO) hücrelerinin %10'u kadar olduğu bulunmuştur (Abdul-Rahman et al., 2002). Buna ek olarak, böceklerdeki N-glikanların yapısal analizlerinde galaktoz içeren yapıların varlığının az olduğu belirtilmiştir.

Memeli hücre N-glikozilasyonunun olgunlaşmasındaki bir sonraki basamak, sialik asitin (Neu5Ac) terminal β 1,4-bağlı galaktoz kalıntılarına sialiltransferazlarla (ST6Gal I ve ST6Gal II) eklenmesidir. Sf9 (Lopez et al., 1999; Hooker et al., 1999; Hollister et al., 2001), Sf21 (Hooker et al., 1999), Tn-5B1-4 (Lopez et al., 1999), Mb0503 (Lopez et al., 1999) ve Ea4 (Hooker et al., 1999) hücrelerinde radyoaktif veya floresan işaretli CMP-Neu5Ac'nın verici substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda sialiltransferaz aktivitesinin çok az olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, son zamanlarda *D. melanogaster* 'de yapılan bir çalışmada, α 2,6-sialiltransferaz'ı kodlayan bir genin varlığı belirtilmiştir. Dokuya ve safhaya özel biçimde embriyonik gelişim boyunca ifade edildiği bulunmuştur (Koles et al., 2004).

2.2.3. Böceklerde N-Bağlı Glikozilasyonun Önemi

North ve arkadaşları ve Aoki ve arkadaşlarının yaptığı kütle spektrometre çalışmaları *Drosophila* embriyonik gelişim boyunca protein substratları üzerinde

bulunan N-glikanların yapısını belirlemiştir. Baskın N-glikan yapıları yüksek mannoz ve az sayıda mannozlu (pausimannoz) ve fukoz bağlı tipler olarak bulunmuştur (Şekil 2.5). Sadece çok az miktardaki hibrid iki anten ve üç antenli karmaşık glikanlar gözlenmiş ve bunların bazılarının $\alpha 2,6$ bağlı sialik asitleri içerdikleri bulunmuştur (North et al., 2006; Aoki et al., 2007).



Şekil 2.5. Böcek Hücrelerinde Bol Bulunan Glikan Yapıları (Ten Hagen et al., 2009'dan uyarlanmıştır)

Bu karşılaştırma memelilerde görülenler ile oldukça farklılık göstermektedir, memelilerde N-glikanlar baskın olarak bol miktarda sialillenmiş hibrit ve karmaşık tiplerdir (Gagneux and Varki, 1999). Bununla birlikte, *Drosophila* N-glikanları diğer bir organizma olan *Caenorhabditis elegans*'daki yüksek fukoz, fosforilkolin ve metillenmiş yapılara sahip N-glikanlara göre memeli N-glikanlarıyla daha benzer gözükmemektedir (Cipollo et al., 2005; Hanneman et al., 2006; Paschinger et al., 2008). İlginç olarak, *Drosophila*'nın N-glikan profili gelişim sürecinde değişmekte, gelişimin farklı safhaları boyunca glikozilasyon mekanizmasının ve belli glikan yapılarının rollerinin özel olarak düzenlendiğini akla getirmektedir (Aoki et al., 2007).

Drosophila'da N-glikan biyosentezi ile ilgili genler henüz karakterize edilmiştir. *Wollknauel* (*wol*), dolikol şeker sentezinden sorumlu UDP-glukoz:dolikil-fosfat glukoziltransferazı kodlamaktadır. Bu genin mutasyonu katlanmamış bir protein yanıtına ve embriyonik düzenin hasarı ile sonuçlanmaktadır (Haecker et al., 2008). N-glikan sentezinin ileriki safhalarıyla ilgili diğer genlerdeki mutasyonlar, sinir sistemi gelişimi ve fonksiyonuna temel olarak etki ediyor gözükmektedir. *Drosophila*'daki bol miktardaki az mannozlu N-bağlı glikanlar *fused lobes* (*fdl*) genine bağlıdır, bu gen N-asetilglukozamini hibrit N-glikanlardan kopararak bu az mannozlu glikanlara dönüşümü sağlamaktadır (Leonard et al., 2006). Bu gendeki mutasyonlar beynin mushroom body β loblarının birleşmesiyle sonuçlanan değişmiş merkezi sinir sistemi (MSS) gelişimine sebep olmaktadır (Boquet et al., 2000). Hibrit N-glikanları oluşturan az mannozlu N-glikanlara GlcNAc'i transfer eden *Drosophila Mgat1* ortologundaki mutasyonlar benzer bir "fused lob" fenotipine sebep olmakta ve bu da hibrit ve az mannozlu N-glikanların merkezi sinir sistemi (MSS) gelişiminde anahtar rol oynadıklarını ileri sürülmektedir (Sarkar et al., 2006). "Fused lob" fenotipine ek olarak, *Drosophila Mgat1* mutantlarında azalmış lokomotor aktivitesi, azalmış yaşam süresi ve erkeklerde kısırlık gözükmektedir, bu da β 1,2-N-asetilglukozaminiltransferaz I'e bağlı N-glikanların ergin sineklerin üremesi ve homeostazında rollerini işaret etmektedir (Sarkar et al., 2006).

Memeliler sialiltransferazları kodlayan düzinelerce gene sahiplerdir. Memelilere zıt olarak, *Drosophila* genomu sadece bir sialiltransferaz genine (*SiaT*) sahiptir (Koles et al., 2004). *Drosophila SiaT* bir α 2,6 sialiltransferaz kodlamakta ve bu sialiltransferaz omurgalı ST6 sialiltransferazı ile evrimsel olarak ilişkilidir. Bu enzim *in vitro* olarak oligosakkaritler ve glikoproteinler üzerine etki etmekte fakat glikolipitler üzerine bir etkisi olmamaktadır. *SiaT* çok fazla doku ve safha spesifik tarzda ifade edilmekte, gelişen MSS'deki hücrelerin sadece çok az bir kısmında bulunmaktadır (Koles et al., 2004). Gerçekten de, *SiaT*'daki mutasyonlar, erginlerde azalmış yaşam süresi, ısıya toleransın azalması, ve azalmış hareket kabiliyetine neden olarak sinir sistemi fonksiyonu üzerine glikanların sialik asit modifikasyonlarının bir rolü olduğunu desteklemektedir (Koles et al., 2004). Günümüze kadar, N-glikan biyosentezi ile ilgili ek genler *Drosophila*'da henüz karakterize edilememiştir, fakat pek çok grup ve merkez

tarafından sürdürülen çalışmalar *Drosophila* gelişimi ve homeostazına katkıda bulunan bu glikanların protein yapı, fonksiyon, işleme ve stabilite ilişkilerine ilişkin görevlerinin araştırılmasına devam etmektedir.

2.3. Böceklerde O-Glikozilasyon ve Önemi

Musin tip O-bağlı glikozilasyon ve bunu başlatan UDP-*N*-asetilgalaktozamin:polipeptit *N*-asetilgalaktozaminiltransferazlar (PGANTs) ailesi *Drosophila*'da korunmuştur. Bununla birlikte, böceklerdeki musin-tip O-glikanlar memeli benzerlerine nazaran daha az uzamıştır, temel olarak kor 1 yapısını (T Ag; Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr) (North et al., 2006), Tn antijenini (Tn Ag; GalNAc α 1-O-Ser/Thr), ve Galaktoz veya GalNAc'den birinin Glukuronik asitle çekirdek 1 yapısına tutunmuş halindeki yapıyı içermektedir (Aoki et al., 2008; Breloy et al., 2008). Sialik asit içeren O-glikanlar henüz bulunamamıştır.

Drosophila, kabul edilen 12 PGANT kodlayan gene sahiptir, bunların dokuzunun *in vitro* olarak biyokimyasal aktiviteleri gösterilmiştir (Schwientek et al., 2002; Ten Hagen and Tran, 2002; Ten Hagen et al., 2003). Bu genlerin ifadeleri hangi proteinlerin gelişim süresinde çeşitli safhalardaki proteinlerin hangilerine (ve bu proteinlerdeki hangi bölgelere) O-glikanların ekleneceğine yön vermektedir (Tian and Ten Hagen, 2006). Gerçekten de, lektinler ve antikorlar ile doku boyama ile gelişimin özel safhalarındaki O-glikan ifade eden çeşitli hücre ve organlar gösterilmiştir (Fredieu and Mahowald, 1994; D'Amico and Jacobs, 1995; Tian and Ten Hagen, 2007a).

Musin tip O-glikozilasyonun hayati rolleri *Drosophila*'da gösterilmiş ve bu glikozilasyonla ilgili gen ailesinin bir üyesi olan *pgant35A* resesif letal olarak bulunmuştur (Schwientek et al., 2002; Ten Hagen and Tran, 2002). Bu musin-tip O-glikozilasyonun herhangi bir organizmanın yaşayabilirliği için gerekli olduğunun ilk gösterimidir. Bu enzim üzerine yapılmış ek bir çalışmada, bu enzimin trake tüp oluşumu boyunca bir role sahip olduğu ortaya çıkmış ve bu organdaki O-glikanların bol oluşu ile tutarlı sonuçlar vermektedir (Tian and Ten Hagen, 2007b).

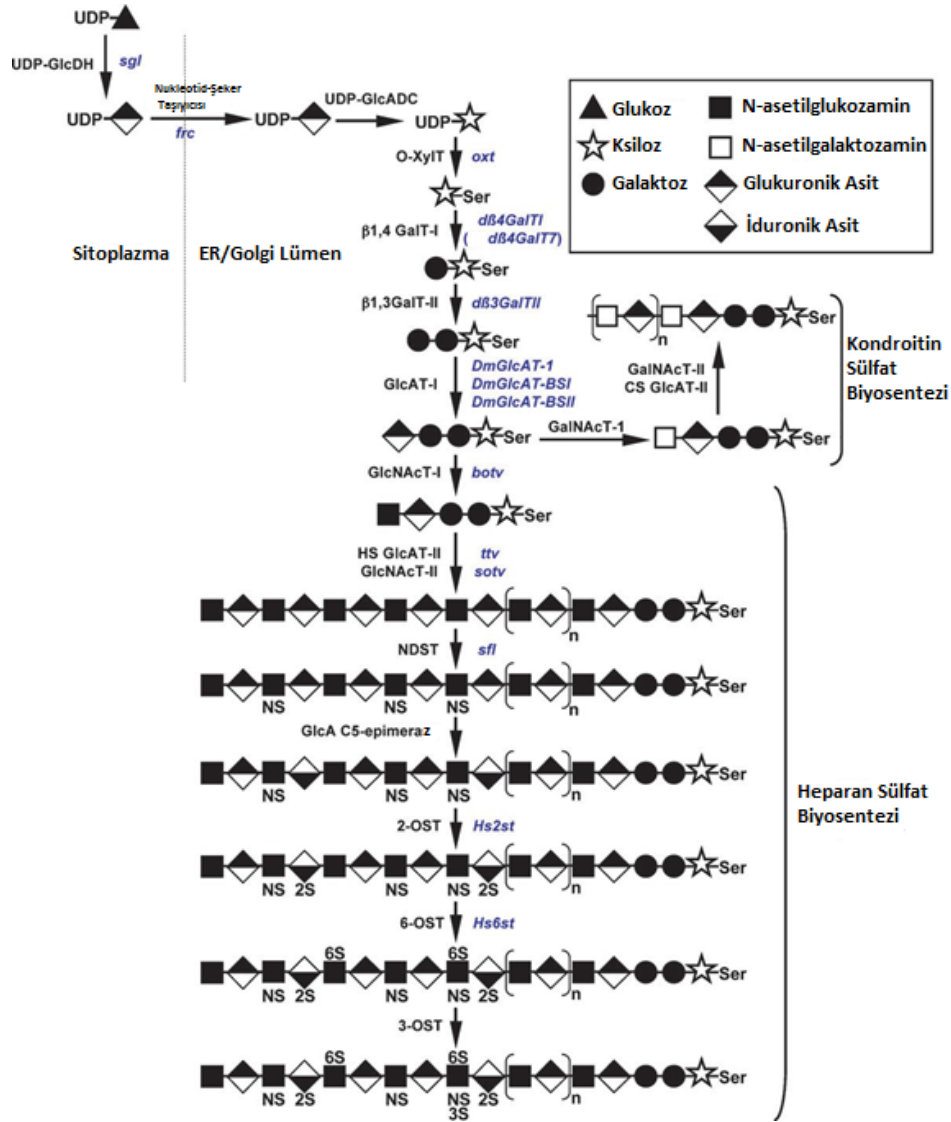
Drosophila'daki gelişen solunum sisteminin apikal ve luminal yüzeyleri boyunca normal olarak bulunan musin tip-O glikanlar *pgant35A* maternal/zigotik mutantlarda eksiktir. Trake sisteminde apikal ve luminal bölgeler boyunca normal olarak görülen proteinler sitoplazmik keseciklerde bulunmakta ve trakeal tüpleri kapsayan lateral bölgelerdeki hücreler boyunca normal olarak bulunan bölmeli desmosom (septat junction, tight junction) proteinleri daha apikal pozisyonlara doğru kayarak apikobazal polarite bozukluklarına sebep olmaktadır. Meydana gelen trakeal tüpler şekil ve çap açısından düzensizdirler ve tam bir difüzyon bariyeri oluşturmazlar. Bu sonuçlar trakeal sistemin apikal ve luminal yüzeylerinin doğru oluşumunda musin tip O-glikanların rolünü işaret etmektedir. Olasılıkla bu yüzeylere yönlendirilmiş proteinlerin trafiği ve korunmasına etki etmesiyle gerçekleşmektedir (Tian and Ten Hagen, 2007a).

2.4. Böceklerde Proteoglikanların Önemi

Drosophila gelişimi sırasında glikanların önemi ilk kez çekirdek proteinlerin serin kalıntısına bağlı bir glikozaminoglikan (GAG) zincirinden oluşan proteoglikanların gelişime etkisinin incelenmesi sırasında keşfedilmiştir. Proteoglikanlar hücre dışı matris içinde veya hücre yüzey molekülleri olarak büyük makromoleküler kompleksler halinde bulunur (Haltiwanger and Lowe, 2004). Hem salgılanan hem de hücre yüzeyinde bulunan proteoglikanlar *Drosophila*'da bulunmaktadır (Ten Hagen et al., 2009). Hücre yüzey proteoglikanları iki sınıfa ayrılır: Glipikanlar, bir glikosilfosfatidilinositol çapa ile plazma zarına demirlemişlerdir. Heparan sülfat (HS) glikozaminoglikanları ile değiştirilmişlerdir. İkinci sınıf, sindekanlar, heparan sülfat veya kondroitin sülfat (KS) zincirleri taşıyan zara gömülü proteinlerdir (Haltiwanger and Lowe, 2004; Ten Hagen et al., 2009). *Drosophila* ve *Drosophila* hücre kültür sistemi çalışmaları gelişim sürecinde hedgehog (Hh), wingless (Wg), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve dekapentaplegik (Dpp)/TGF- β sinyal yollarında proteoglikanların rolünü tanımlayan bir dizi farklı modellerin ortaya konmasına yol açmıştır (Nybakken and Perrimon, 2002, Hacker et al., 2005). Bu modeller, şunları içerir: (1) Proteoglikanlar reseptör-ligand etkileşimini arttırmak için koreseptörler olarak hareket eder, (2) Proteoglikanlar etkin bir reseptör bağlanması için gerekli ligand dimerleşmesine yardım eder (3) Proteoglikanlar

ligand / morfojen derecelenmesini, ligand difüzyonunu, taşınımını, kararlılığını, salgılamayı veya endositozu düzenleyerek etkiler. Proteoglikanlar rolünü tanımlayan ilk bilgi GAG zincirlerinin bağlandıkları çekirdek proteinleri kodlayan genlerin mutasyon analizlerinden gelmiştir. GAG biyosentezi ve modifikasyonundan sorumlu genlerin önemi genetik çalışmalarla ortaya konmaya devam etmektedir.

GAG sentezi proteoglikan olmaya aday proteinlerin peptit omurgasına bir ksiloz ilave edilmesi ile başlatılır (Şekil 2.6). *Drosophila* bu eklenmenin katalizinden sorumlu bir ksiloziltransferaza (OXT geni tarafından kodlanan) sahiptir (Wilson, 2002; Brunner et al., 2006). Bu gendeki kusurlar henüz karakterize edilmemiştir. Çekirdek ksiloz sonra *dβ4GalT7* (ayrıca *dβ4GalTI* olarak da bilinir) geni ile kodlanan tek bir β1,4-galaktoziltransferazın (β1,4GalT-I) galaktoz eklenmesi ile uzatılır (Nakamura et al., 2002; Takemae et al., 2003). *dβ4GalT7*'ye özgü RNAi ile *Drosophila*'da bozulmuş HS ve KS biyosentezi anormal kanat ve bacak morfolojisine, Hh ve Dpp sinyal iletiminde hatalara sebep olmuştur (Nakamura et al., 2002; Takemae et al., 2003). Yolakda bir sonraki adım bir proteoglikan β1,3-galaktoziltransferaz (*dβ3GalTII* geni tarafından kodlanan) tarafından katalize edilen Galβ1-4Xyl disakkarit çekirdeğe galaktoz aktarılmasıdır. *dβ3GalTII*'ye özgü RNAi , heparan sülfat proteoglikanları (HSPG'lerin) düzeylerinde ve hücre dışı Wg düzeylerinde azalmaya neden olmuştur (Ueyama et al., 2008). *Drosophila* ayrıca *DmGlcAT-I*, *DmGlcAT-BSI* ve *DmGlcAT-BSII* (BS, "geniş özgünlük" anlamına gelir) genleri tarafından kodlanan üç glukuronil transferaz ifade etmektedir. *DmGlcAT-I* proteoglikanların bağlantı bölgesi trisakkaritine (Galβ1-3Galβ1-4Xyl) GlcA aktarmak için seçicilik göstermektedir (Kim et al. 2003). Bunun aksine, *DmGlcAT-BSI* ve *DmGlcAT-BSII* glukuronik asiti (GlcA) proteoglikanlar, glikolipidler ve glikoproteinler gibi geniş bir substrat aralığında çalışarak aktarır, bu da çeşitli *Drosophila* glikanlarının sentezi ve uzatmasında görevlerini ortaya çıkarmaktadır (Kim et al., 2003). İlginç bir şekilde, *DmGlcAT-BSI* ve *DmGlcAT-BSII* gelişim sırasında yaygın olarak ifade edilmekte, bu da sialik asitlerin çok sınırlı olduğu düşünüldüğünde glukuronik asitin (GlcA) ana negatif yüklü şeker olarak rol oynayacağını göstermektedir.



Şekil 2.6. Glikozaminoglikanların Biyosentezi (Ten Hagen et al., 2009'dan uyarlanmıştır)

GAG biyosentezinin bir sonraki basamağı EXT (hereditary multiple exostosin) gen ailesinin üyeleri tarafından kataliz edilir. *Brother of tout velu* (*botv*) HSPG'lerin çekirdek tetrasakkaritine N-asetilglukozamin (GlcNAc) ekleyen bir N-asetilglukozaminiltransferaz kodlamakta ve ayrıca zincir uzamasını sağlamaktadır (Han et al., 2004; Izumikawa et al., 2006). *Tout velu* (*ttv*) ve *sister of tout velu* (*sotv*) HS zincirlerinin uzaması için sırayla ve tekrarlayan şekilde GlcA ve GlcNAc eklenmesinden sorumlu bir bileşeni oluşturan enzimleri kodlamaktadır (Han et al. 2004; Izumikawa et al. 2006). *Ttv*, *sotv* veya *botv*'deki mutasyonlar bozuk Wg, Hh ve Dpp sinyalleme ve azalmış veya yok olmuş HS sentezine sebep olmakta, bu da morfogon derecelenmesinde GAG'ların kritik rolünü işaret etmektedir (Toyoda et al., 2000; Takei et al., 2003; Han et al., 2004;

Dasgupta et al., 2007). Dahası, *sugarless (sgl)* veya *sulfateless (sfl)* genlerindeki (sırasıyla UDP-glukoz dehidrogenaz ve *N*-deasetilaz/*N*-sulfotransferaz kodlayan) mutasyonlar FGFR (fibroblast büyüme faktörü reseptörü) sinyal iletimindeki kusurlara benzeyen bozulmuş trake morfogenezine sebep olmaktadır (Lin et al. 1999; Selleck 2000; Toyoda et al., 2000).

GAG biyosentezi ve modifikasyonu ile ilgili ek genler iki sülfotransferazın (*Hs2st* ve *Hs6st*) kodlanmasıyla ilgilidir. Bu iki genden sadece birinin mutasyonu sülfasyonda önemli kusurlara sebep olmazken, iki genin birden mutasyonu FGF sinyal iletiminde ciddi bozukluklara sebep olarak GAG sülfasyon seviyelerinin önemini göstermektedir (Kamimura et al. 2006; Xu et al. 2007). Ayrıca, Fringe bağlantısı (*frc* geni tarafından kodlanan) UDP-GlcA'yı (ve diğer nükleotid şekerleri) ER/Golgi içine taşır, daha sonra proteoglikan biyosentezini hem de diğer glikanların sentezini etkiler (Goto et al., 2001; Selva et al., 2001). Bu çalışmalar, proteoglikanların GAG içerikleri ve sentezlerini düzenleyen enzimlerin gelişmenin çok çeşitli aşamalarında görev yaptığını göstermektedir.

2.5. Karbohidratların Sinir Sistemindeki Önemi

2.5.1. Sialik Asit

Sialik asitler yüksek hayvanlarda ve bazı mikroorganizmalarda bulunan elektronegatif olarak yüklü monosakkaritlerdir (Varki, 1992; Schauer and Kamerling, 1997). Bunlar, hücre zarlarındaki çoğu protein ve lipidlerin ve salgılanmış makromoleküllerin temel bileşenleri olan karmaşık karbohidratların muazzam yapısal çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır (Varki et al., 2009). Sialik asit göze çarpacak şekilde genellikle bu moleküllerin dış ucunda konumlanmıştır. Glikan zincirlerinin çeşitliliği, çeşitli tipteki Sia'ların biyosentezi ile daha da artmakta (Schauer, 2000a,b), bu da glikokonjugatlar tarafından kullanılan “yaşamın üçüncü dili”nin karmaşıklığını etkili hale getirmektedir. Birinci ve ikinci diller nükleik asitlerin ve proteinlerinkilerdir. Dördüncü dili de daha iyice deşifre edilmesi gereken lipidlerindir.

Sialik asitler ağırlıklı olarak glikan zincirlerindeki galaktoz kalıntılarına $\alpha 2,3$ veya $\alpha 2,6$ bağlarıyla bağlanan terminal monosakkaritler olarak bulunmaktadır (Çizelge 2.2). Memeliler ayrıca polisialik asit (PSA) olarak bilinen

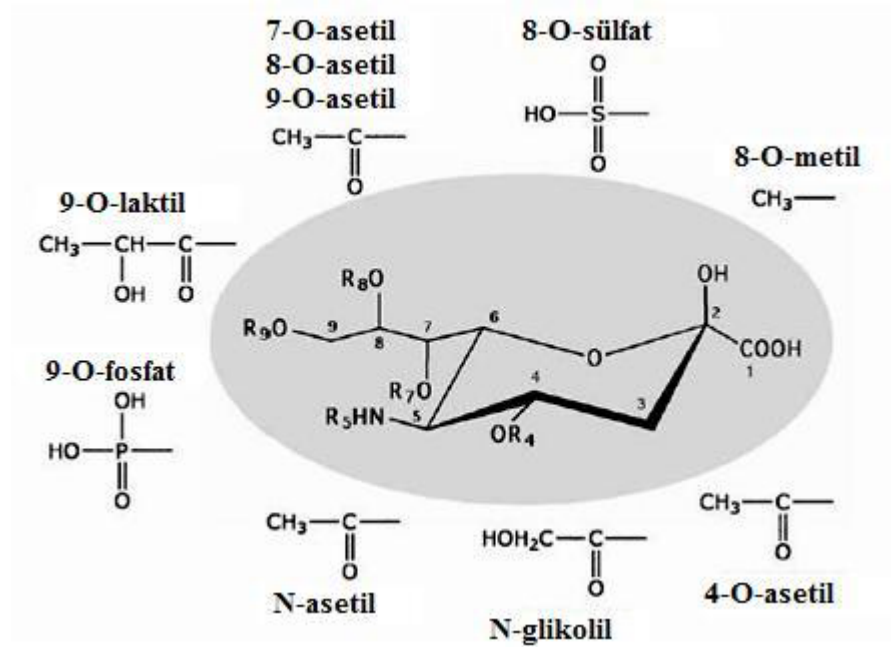
α 2,8 bağı sialik asit homopolimerini oluşturmaktadır (Edelman, 1986; Rutishauser and Landmesser, 1996). Her glikoform bu şekerleri içeren glikoproteinler ve glikolipitlere benzersiz işlevler kazandırmaktadır. Sialik asitler hücre-hücre tanıma etkinlikleri ve kanser (Bast et al., 1996; Ajioka et al., 1996; Malykh et al., 2001), iltihabi hastalıklar (Corfield et al., 1988; Crocker et al., 1997; Kalela et al., 2000) ve viral enfeksiyon (Huberman et al., 1995; Ciarlet et al., 2001; Alexander and Dimock, 2002; Gee et al., 2006) gibi hastalıkların patogeneze katılımları nedeniyle günümüze kadar çok ilgi görmüştür. Biyomedikal araştırmalar için engelleyicileri veya problemleri olarak sialik asit analoglarının geliştirilmesi, karbonhidratların bu önemli ailesi hakkındaki bilgilerin anlaşılmasında önemli ilerlemelere yol açmıştır.

Çizelge 2.2. Genel olarak bulunan sialil-oligosakkarit yapıları (Tsuji, 1996)

Bağ Tipi	Sialil-Oligosakkarit Yapısı	Bulunduğu Glikokonjugatlar
α 2,3	NeuAc α 2,3Gal β 1,4/3GlcNAc	N-glikan, polilaktozamin, gangliosit
	NeuAc α 2,3Gal(β 1,4Glc) β 1,1'-Cer	Gangliosit
	NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc	O-glikan, gangliosit
α 2,6	NeuAc α 2,6Gal β 1,4/3GlcNAc	N-glikan, polilaktozamin, gangliosit
	NeuAc α 2,6GalNAc	O-glikan
	Gal β 1,3(NeuAc α 2,6)GalNAc	O-glikan, gangliosit
	Gal β 1,4/3(NeuAc α 2,6)GlcNAc	N-glikan, gangliosit
α 2,8	NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal	Gangliosit
	(NeuAc α 2,8) _n NeuAc α 2,3Gal	N-glikan (NCAM, Na ⁺ Kanalı α -altünitesi), gangliosit

2.5.1.1. Sialik Asitlerin Çeşitliliği ve Doğadaki Dağılımı

Sialik asit (Sia), nöraminik asit (5-amino-3,5-dideoksi-D-glisero-D-galakto-non-2-ulopyranosonik asit) türevleri olan 60'dan fazla üyeye sahip bir monosakkarit ailesidir. Bunlar, amino ya da hidroksil gruplarında çeşitli değişkenler taşımaktadır (Şekil 2.7) (Corfield and Schauer, 1982a; Varki, 1992; Schauer and Kamerling, 1997; Schauer, 2000a,b; Angata and Varki, 2002). Tüm glikozidik olmayan hidroksil kalıntıları bir ya da çeşitli asetil grupları bulunurken nöraminik asidin amino grubu asetillenmiş ya da glikolillenmiştir.



Şekil 2.7. Doğada Görülen Sialik Asit ve Türevleri (Schauer and Kamerling, 1997'den uyarlanmıştır)

Genellikle, sadece bir O-asetil grubu, çoğunlukla O-9'da, bulunmaktadır ancak özellikle sığır çenealtı bezi ve insan kolonundaki musinlerde di- ve tri-O-asetillenmiş Sia da bilinmektedir (Corfield and Schauer, 1982a). O-9'da laktıl ya da fosforil kalıntıları ve O-8'de metil ya da sülfat grupları görülebilir. Tüm bu farklı değişken gruplar birlikte, örneğin 8-O-metil'le, 9-O-asetil ve N-glikolil, hayvanlar aleminde bulunan çeşitli Sia tiplerini oluşturmaktadır. Bu tiplerin dışında, anhidro ve lakton formu gibi doymamış Sia'lar çeşitli biyolojik kaynaklarda tespit edilmiştir.

5-Deamino-5-hidroksi-nöraminik asit veya 2-keto-3-deoksi-nononik asit (KDN) giderek artan bir şekilde mikroorganizma ve hayvanlarda tespit edilmektedir. N-asetilnöraminik asitin (Neu5Ac) de-N-asetile ürünü olan Nöraminik asit (Neu), memeli glikokonjugatlarının diğer bir bileşenidir.

Doymamış sialik asit (2-deoksi-2 ,3-didehidro sialik asit) ve N-asetilnöraminik asit-9-fosfat (Neu5Ac9P) haricindeki bu Sia'lar, oligosakkaritlerin, polisakkaritlerin, glikoproteinlerin, gangliositlerin ve lipopolisakkaritlerin genellikle glikozidik bağlarında bulunmaktadır (Corfield and Schauer, 1982a; Varki, 1992; Schauer et al., 1995; Schauer and Kamerling, 1997; Mühlenhoff et al., 1998). Neu5Ac9P, Sia biyosentezinde bir ara maddedir (Corfield and Schauer, 1982b).

N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac), N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc) ve N-asetil-9-O-asetilnöraminik asit (Neu5,9Ac2) Sia ailesinin en sık rastlanan üç üyesidir. Sadece Neu5Ac'e çok sık rastlanırken, diğerleri bütün türlerde bulunmaz. Neu5Ac yanısıra iyi araştırılmış bir örnek olan Neu5Gc, hayvanlar aleminde sık ortaya çıkmaktadır fakat sağlıklı insan dokularında ve bakterilerde tespit edilememiştir.

Sia'nın bütün çeşitleri bir hücre veya organizmada hiçbir zaman bulunamamıştır. Dağılımları hayvan ve hücre türlerinin yanı sıra, bir hücrenin fonksiyonuna bağlıdır ve kuvvetlice gen seviyesinde düzenleniyor olarak görülmektedir. Şimdiye kadar bilinen farklı en yüksek miktarda Sia içeren hayvan inektir. Çenealtı bez musininde 15 tipi belirlenmiştir, çoğu Sia yan zincirinde O-asetillenmiştir, fakat aynı zamanda N-asetilli ya da N-glikolilli oldukları gibi 9-O-laktillenmişler de bulunmaktadır (Schauer and Kamerling, 1997; Klein et al., 1997). İnsanlarda, Sia tiplerinin sayısı daha azdır, yaygın olarak Neu5Ac ve ardından sialik asit yan zinciri O-asetillenmiş ve O-laktillenmiş olan türevleri gelmektedir. Dikkate değer olarak, derisidikenlilerde, en iyi *Asterias rubens* incelenmiştir ve birçok Sia tipleri bilinmektedir. Bunlardan bazıları Neu5Ac, Neu5Gc ve O-asetillenmiş türleri ve iz miktardaki dehidro türevler gibi yüksek hayvanların iyi bilinen monosakkaritlerini temsil etmektedir. *A. rubens*'de, bu Sia'ların büyük bir yüzdesi ilave olarak O-8 pozisyonunda metillenmektedir ve

diğer ekinodermlerde bu pozisyonda sülfatlanmıştır. Yüksek hayvanların musinlerinde az miktarlarda 8-O-metil ve 8-O-sülfatlı Sia oluşumu rapor edilmiştir (Zanetta et al., 2001). Derisidikenlilerdeki Sia türlerinin bu geniş bolluğu, çeşitli Sia tiplerinin oluşumuyla ilgili enzimlerin ilk olarak deuterostomların evrildiği dönemde yani en az 500 milyon yıl önce eksprese edildiği anlamına gelir. Neu5Ac'de bu zamandan itibaren oluşmuş olabilir çünkü Sia derisidikenlilerden daha düşük hayvanlarda düzenli olarak bulunmamaktadır. Dikkate değer bir şekilde, Neu5Ac *Drosophila melanogaster* embriyogenezinin kısa bir döneminde (Roth et al., 1992) ve ağustosböceği *Philaenus spumarius* larvalarında (Malykh et al., 1999), büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella*'nın protorasik bezlerinde (Karaçalı ve ark., 1995b, 1997, 1999, 2000, 2010) ve testislerinde (Karaçalı ve ark., 1999), çekirge *Docostaurus maroccanus*'un hemolenfinde (Karaçalı ve ark., 2003) ve afrika çekirgesi *Locusta migratoria*'da (Karaçalı ve ark., 1995a) ortaya çıkmaktadır. Neu5Ac ayrıca kalamar ve pasifik ahtapotu glikolipidlerinde (Saito et al., 2001) hem de tatlı su karidesi *Macrobrachium rosenbergii* (Sierra et al., 2001) hematositlerinde tespit edilmiştir. Modern analiz yöntemlerinin geliştirilmesi nedeniyle Sia'nın diğer alt hayvanlarda bulunması ileriki dönemlerde şaşırtıcı olmayacaktır.

Bu durum, bu asidik monosakkaritlerin düşük hayvanlardan bulunmadığına ve bu hayvanlarda fonksiyonel olarak üronik asit veya fosforile veya sülfatlanmış glikanlar gibi diğer asidik şekerlerle temsil edildiğine (Faillard and Schauer, 1972) dair mevcut görüşü çürütebilir. Çok detaylı çalışmalara rağmen, açık bir şekilde bitkilerde Sia bulunmamaktadır. Shah ve arkadaşları (2003) *Arabidopsis thaliana* süspanse hücre kültüründe Neu5Ac ve Neu5Gc bulmalarına rağmen, daha sonraki çalışmalarda bu rapor kabul görmemiştir (Seveno et al., 2004). Arkeabakterilerde, ökaryotik hücrelerin ataları, bununla birlikte, bazı Sia-metabolize eden enzimlerin homolog gen dizilerinin bulunduğu ancak ilişkili organizmalarda Sia'nın ifade edildiği bulunamamıştır.

Chagas hastalığı (Schenkman et al., 1991) ve uyku hastalığına sebep olan Amerika ve Afrika tripanozomları gibi bazı protozoalar, yaşam döngülerindeki çeşitli safhalarda dış yüzeylerinde sialik asit taşırlar. Kendileri Sia'yı sentezleme yeteneğinde değildirler fakat trans-sialidaz adı verilen özel bir enzimle gerek

böcek vektörünün kanından gerekse kan akımındaki yaşamları boyunca konukçu materyalden Sia elde ederler. Sia'yı elde etme mekanizmaları henüz bilinmemesine rağmen, patojenik funguslar da yüzeylerinde sialik asit taşırlar (Alviano et al., 1999). Buna ek olarak, *Cryptococcus neoformans*'da da bir sialiltransferaz keşfedilmiştir (Rodrigues et al., 2003).

Sia ayrıca seyrek de olsa prokaryotik organizmalarda da görülür. Bunların bazıları kendi biyosentetik mekanizmalarına sahip olmalarına karşın, diğerleri Sia'yı çevreden elde ederler (Vimr and Lichtensteiger, 2002). Bu süreçlerle ilgili bütün enzimlerin özellikleri ve gen yapıları hayvanlardakilerle benzer olduğu için, bu organizmaların konukçu hücrelerden doğal gen aktarımıyla bunları elde ettikleri olası görülmektedir (Schauer and Vliegthart, 1982).

İnsan ve maymunlar arasında Sia açısından çarpıcı bir kimyasal farklılık bulunmaktadır çünkü insanlar bir gen mutasyonu nedeniyle Neu5Gc ifade etmezler (Irie et al., 1998). Özellikle tümör dokularında insanlardaki iz miktardaki Neu5Gc'nin kaynağı henüz açıklanamamakta fakat diyetle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Malykh et al., 2001; Tangvoranuntakul et al., 2003). Neu5Gc birbiriyle ilişkili çeşitli düşük omurgalılarda da bulunmamaktadır. Bunlar tavuk (Varki, 1992; Schauer and Kamerling, 1997), kırlangıç, ördek, hindi, devekuşu gibi çeşitli türlerdeki kuşlardır. İmmun boyamayla ördeklerin gastrointestinal bölgesinde Neu5Gc bulunmuş, fakat bu Sia'nın yiyeceklerde bulunması mevcudiyetinin tartışılmasına sebep olmuştur (Ito et al., 2000). Neu5Gc ayrıca Afrika timsahında, kurbağa *Rana esculata* ve amfibi *Xenopus laevis*'de bulunmamaktadır.

O-asetile Sia'da çok geniş çapta dağılmıştır ve en az iki gen tarafından kontrol edilmektedir. Yan zincirinden O-asetillenmiş Sia, genel olarak C-9'da, derisidikenlilerden itibaren yüksek hayvanlarda ve ayrıca bazı bakterilerde en dominant olandır, oysa ki 4-O-asetilasyon dikenli karıncayiyen'den at'a kadar olan hayvanlar alemi boyunca bireysel türlerde rastgele olarak görünmektedir (Varki, 1992; Schauer and Kamerling, 1997; Schauer, 2000b; Schauer et al., 2001). Genişletilmiş araştırmalarla piranoz halkasında O-asetillenmiş Sia'yı eksprese eden kesinlikle daha fazla hayvan türü tespit edilebilecek ve bu

çalışmalar bu moleküler modifikasyonun evrimsel ve fonksiyonel yönlerinin aydınlatılmasına yardımcı olabilecektir.

2.5.1.2. Sialik Asitlerin Fizyolojik ve Patofizyolojik Roller

Sia'ların rolleri; değişken yapılarına ve kimyasal modifikasyonlarına bakmaksızın genel olarak ikiye ayrılabilir: Tanıma bölgelerini maskeleyerek (Schauer, 1985) ya da aksine bir reseptör proteini tarafından tanımayı izin vererek bir biyolojik hedef oluşturma (Kelm and Schauer, 1997). İkinci rol Sia değişken grupları tarafından (en etkin olarak O-asetil grupları tarafından) şekillendirilip iptal edilebilmektedir. Bu monosakkaritlerin çevresi ve bağlı oldukları molekül yapısı biyolojik etkilerini değiştirebilmekte ve bu çeşitli olasılıklar Sia'nın anlaşılmasını zor hale getirmektedir. Ancak, eğer hücrelerdeki Sia miktarı artar veya azalır veya eğer Sia'nın doğası belirli bir hücre veya doku değişikliklerinde tipikse biyolojik olayların tahmin edilmesi için bir temel sağlar.

Negatif yükleri nedeniyle Sia pozitif yüklü moleküllerin bağlanması ve taşınmasının yanı sıra hücreler ve moleküllerin çekimi ve itilmesi ile ilgilidirler (Faillard and Schauer, 1972; Schauer, 1982a, 1982b, 2000b; Varki, 1992; Schauer and Kamerling, 1997). Bu şekilde, örneğin bağırsakta ya da kurbağa yumurta yüzeyinde glikoprotein bileşenleri olarak, endoteli kaplayan ve koruyan münlerin yüksek viskozitelerine katkı sağlamaktadır. Benzer bir şekilde, örneğin, gangliosidlerin yapılarını etkilemekte (Siebert et al., 1996) ve hücre zarlarındaki çok moleküllü yapılara katkıda bulunarak fonksiyonlarına etki etmektedir. Sia'ların bu fizikokimyasal özellikleri O-asetil ya da O-metil grupları gibi hidrofobik eklentilerden ya da daha hidrofobik özellikler ve glikozidik bağlantı için başka bir bölge sağlayan N-asetil grubunun hidroksilasyonundan etkilenmektedir. Sülfasyon ile, derisidikenlilerde gözlendiği gibi, çok asidik bir Sia oluşturulur. Sia'nın negatif yükü, aynı zamanda, glikoproteinlerde Sia'nın anti-proteolitik etkisine katkısının yanı sıra, bazı endoglikozidazların etkisinin engellenmesine katkıda bulunur (Faillard and Schauer, 1972; Schauer and Kamerling, 1997).

İkinci gözlemler negatif yüklerle birlikte hacimli ve hidrofobik molekül özellikli Sia'nın tanımayı engelleyici etkileri altında gruplanabilir. Bu, doğası

reseptörler tarafından tanınmak için tasarlanmış sondan bir önceki şekerlerin (galaktoz gibi) maskelenmesinden veya makromoleküllerdeki veya hücre zarlarındaki antijenik bölgelerin daha az seçici korunmasından oluşan çok geniş ve önemli bir alandır (Schauer, 1985; Kelm and Schauer, 1997). Desialilasyon, ilk durumda, galaktoz-spesifik lektinler tarafından tanınmaya, ikinci durumda, kompleman ya da bağışıklık sistemi tarafından makromoleküllerin ve hücrelerin daha iyi tanınmasına yol açmaktadır. Birinci etkinin amacı, molekülleri ve hücreleri özel bölgelere hedeflemektedir ancak bu genellikle parçalanmaya sebep olmaktadır. Bu nedenle, bu fizyolojik veya patolojik bir öneme sahip olabilmektir (Schauer, 2000b).

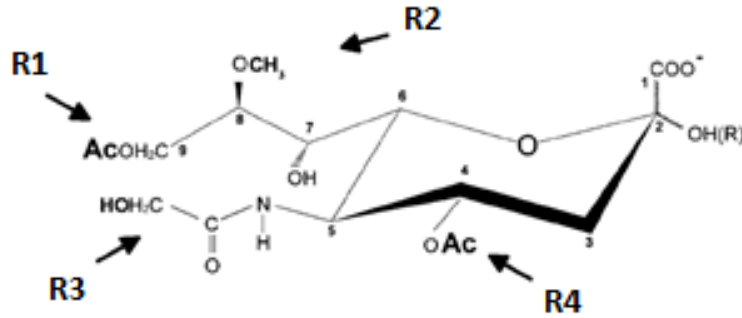
Bu fenomenin ilk yayınlanmış örneği, hepatositler tarafından desialillenmiş serum glikoproteinlerinin yakalanması olmuştur (Ashwell and Morell, 1974). Benzer bir fonksiyon, karaciğer ve dalak makrofajları ve eritrositleri arasında gözlenmiş, ilk olarak insan kırmızı kan hücreleri yüzeyindeki Sia'ların %10-20'sini ($1-2 \times 10^7$ molekül/hücre) ya yaşlanmayla ya da kan serumu veya mikroorganizmalardaki sialidaz etkisi altında kaybetmiş olduğu gözlenmiştir (Jancik and Schauer, 1974). Kırmızı kan hücreleri, maskesi kaldırılmış galaktoz kalıntıları ile fagositlerin galaktoza özel reseptörüne bağlanır ve son olarak alınıp parçalanır (Muller et al., 1983). Bu mekanizma, immunoglobulin veya kompleman katılımı olmadan çalışmakta ve yaşlı hücrelerin temel uzaklaştırılma sürecini belirlemektedir (Bratosin et al., 1998).

Sialidazla muamele edilmiş lenfositler ayrıca bu mekanizma ile makrofajlara tutunmakta, bununla birlikte yutulmamakta ancak hücre yüzeyinin tekrar sialilasyonuna bağlı olarak yaklaşık bir günlük beklemeden sonra serbest bırakılmaktadır (Fischer et al., 1991). Ayrıca malign hücreler bu şekilde elimine edilmekte fakat genellikle bu tür hücrelerde gözlenen fazla sialilasyonun humoral ve hücrel savunma sistemlerinden onları koruduğu ve böylece onların kötü huyluluklarını arttığı söylenmektedir (Schauer, 2000b).

Sialik asit molekülleri çeşitli tanıma süreçlerinde yer alırlar. Özellikle memeli hücrelerinin etkileşimlerine katılımlarının sadece son yirmi yıldan bu yana anlaşılmasıyla, bu durumun bu monosakkaritlerin en önemli rolü olduğu

düşünülmektedir. O zamana kadar, Sia-tanım reseptörlerinin sadece bazı virüsler, bakteriler, düşük hayvan ve bitkilerde olduğu bilinmekteydi (Kelm and Schauer, 1997; Varki, 1997). Sıçan periton makrofajlarının galaktoz-reseptörleri çalışılırken, Sia'nın afinite üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğu keşfedilmiş (Lee et al., 1990), böylece Sia'nın sadece tanımayı engelleyici işleve sahip olmayabileceği düşünülmeye başlanmıştır. Daha sonra Paul Crocker ve ekibi, sıçan kemik iliği hücre makrofajlarında Sia-bağlayıcı lektinleri (Sialoadhezin) keşfetmiştir (Crocker et al., 1991). Bu reseptör, şimdiye kadar, en az on üyesi çeşitli laboratuvarlarda keşfedilmiştir. Bütün bu reseptörler "Siglecler" olarak adlandırılmıştır (Crocker et al., 1998).

Maskeleme ajanı olarak ya da reseptör olarak Sia'nın bu temel rollerine kimyasal modifikasyonları da (Şekil 2.8) etki etmektedir (Schauer and Kamerling, 1997; Kelm and Schauer, 1997; Schauer et al., 1999, 2001; Schauer, 2000b).

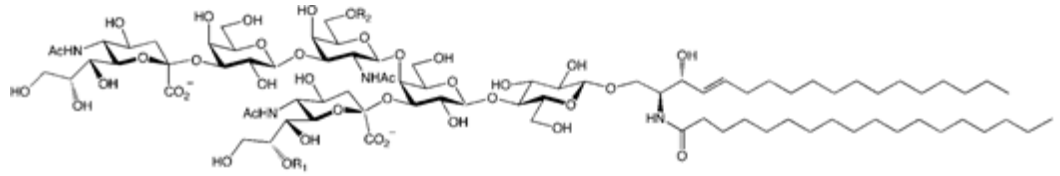


Şekil 2.8. Sialik Asiti Modifiye Eden Grupların Biyolojik Önemi. **R1** : Hidrofobikliği düşürür, Sialidaz, trans-sialidaz ve sialat-pirüvat liyaz aktivitelerinin azaltılması, Sialik asit reseptör etkileşimlerinin engellenmesi (virüsler, memeliler), Virüs bağlanması için epitop, Omurgasız lektin bağlanması için epitop, Mikroorganizmaların kolonileşmesi ve virülansının ayarlanması, Morfogenezde rol, Tümörle ilişkili antijen, Kompleman reaktivitesine etki, İmmun reaksiyonların ayarlanması. **R2**: Sialidaz etkisinin düşürülmesi, Glikozilasyona etki, örn; polisializasyon veya dallanma. **R3**: Hidrofobikliği arttırır, Sialidaz, trans-sialidaz ve sialat-pirüvat liyaz aktivitelerinin azaltılması, Virüs, bakteri, bitki, omurgasız ve memeli lektinleri için bağlanma, Memeli reseptörleri ile tanınmanın engellenmesi, İmmun yanıtın ayarlanması, Kan grubu determinantı, Tümörle ilişkili antijen, Farklılaşma markeri, Ester formasyonu ve glikozilasyonla ilişkili, Ekinodermelerde spesifik rol. **R4** : Hidrofobikliği düşürür, Sialat-pirüvat liyaz ve çoğu sialidazların etkisine karşı dayanıklılık kazandırma, Fare hepatit virüsü için çapraz reseptör, Grip virüsleri için inhibitör. (Schauer, 2000a'dan uyarlanmıştır)

2.5.1.3. α 2,3 Bağlı Sialik asit ve Miyelin-İlişkili Glikoprotein

Sialik asit sinir sisteminde genellikle Siglec (sialik asit bağlayıcı immunoglobulin-benzeri lektin) protein ailesi tarafından tanınan bir karbonhidrat motifi olan α 2,3 bağlı sialik asit olarak ifade edilir. İnsan Siglecleri her biri sialik asitle etkileşime giren ortak bir V-set immünoglobulin domaini içeren en az 13 üyeden oluşmaktadır (Crocker et al., 2007). Yaygın bir biçimde çalışılmış etkileşimlerden biri myelin bağlantılı glikoprotein (aynı zamanda Siglec-4 olarak bilinmektedir, MAG) α 2,3 sialik asitle bağlanmasıdır. MAG miyelinli glia hücrelerinde ifade edilen 100 kDa'luk integral bir zar glikoproteinidir (Trapp, 1990; Kelm et al., 1994). Bu glikoprotein, miyelin oluşumunu ve muhafazasını düzenlemeyle ilişkilidir (Schachner and Bartsch, 2000) ve erişkin merkezi sinir sistemindeki (MSS) sinir onarılmasını engellediği öne sürülmektedir (Mukhopadhyay et al., 1994; Filbin, 1995; DeBellard et al., 1996). MAG kusurlu fare, gecikmeli miyelinizasyon (Montag et al., 1994), periaksonal boşluğun organizasyon kusurları (Li et al., 1994) ve miyelin kılıfın ince morfolojik anormalliklerini göstermektedir (Montag et al., 1994). Gangliositler olarak bilinen sialik asit içeren glikosfingolipidlerle MAG etkileşimleri kapsamlı olarak araştırılmış ve bu araştırmalar miyelin oluşumu ve sinir onarılmasındaki MAG rolüne ilişkin bilgilere katkıda bulunmuşlardır.

MAG tercihen hücre yüzeyi gangliositleri ve glikoproteinlerin O-glikanları üzerinde ifade edilen (Kelm et al., 1994) glikan yapı Neu5Ac α 2-3Gal β 1,3GalNAc'a bağlanır (Crocker et al., 1996). Gangliositler beyinde sialik asit ifadesinin önemli bir kaynağı olarak görülmektedir. MAG, kolinerjik nöronlar üzerinde ifade edilen küçük bir gangliosit olan polisialogangliosit GQ1b gibi önemli beyin gangliositleri olan GD1a ve GT1b'e yüksek bir afinite ve özgüllükle bağlanmaktadır (Şekil 2.9) (Yang et al., 1996; Collins et al., 1997; Vyas et al., 2002).



Gangliosit

GD1a, R₁ = H, R₂ = H

GT1b, R₁ = Neu5Ac, R₂ = H

GQ1bα, R₁ = Neu5Ac, R₂ = Neu5Ac

Acılımı

Neu5Acα(2-3)Galβ(1-3)GalNAcβ(1-4)[Neu5Acα(2-3)]Galβ(1-4)Glc(1-1')Cer

Neu5Acα(2-3)Galβ(1-3)GalNAcβ(1-4)[Neu5Acα(2-8)Neu5Acα(2-3)]Galβ(1-4)Glc(1-1')Cer

Neu5Acα(2-3)Galβ(1-3)[Neu5Acα(2-3)GalNAcβ(1-4)[Neu5Acα(2-8)Neu5Acα(2-3)]Galβ(1-4)Glc(1-1')Cer

Şekil 2.9. MAG'a Bağlanan Gangliositlerin Yapıları (Murrey and Hsieh-Wilson, 2008'dan uyarlanmıştır)

Sialik asit kalıntılarına parçalayan bir enzim olan nöraminidazla sıgır beyninden izole edilmiş gangliositlerin sindirimi yoluyla, MAG'ın bu gangliositlere bağlanması engellenmiş ve sialik asit kısımlarının MAG-gangliosit etkileşimlerine aracılık ettiğinin önemi bu şekilde gösterilmiştir.

Çalışmalar sialik asit içeren gangliositlerin MAG'la olan ilişkisinin nöron büyümesinde önemli bir işlevsel rol oynadığını düşündürmektedir. MAG'ın *in vitro* akson uzantısını engelleme yeteneği, beyincik granül nöronlarının nöraminidaz ya da bütün glikosfingolipit sentezini engelleyen glukozilseramit sintaz engelleyici P4 muamelesi ile engellenmiştir (Vyas et al., 2002). Ayrıca, glikoziltransferaz geni GalNAcT (UDP-N-asetilgalaktozamin: GM3/GD3 N-asetilgalaktozaminiltransferaz) eksik fareler GD1a ve GT1b gibi karmaşık gangliositleri ifade edemez ve sonuç olarak, akson bozulması ve bütün olarak miyelinasyon eksikliği sergilerler (Sheikh et al., 1999; Chiavegatto et al., 2000). Bu fareler aynı zamanda denge, refleks ve motor koordinasyon kusurları gibi nöral bozukluk ile ilişkili ilerleyen davranış anormallikleri sergilemektedir (Chiavegatto et al., 2000). Böylece, MAG ve siallenmiş glikanlar ile etkileşimleri hakkındaki detaylı bilgiler elde edilmesinin, multipl skleroz gibi mielinlenme bozuklukları hakkındaki mevcut bilgileri geliştirebileceği ve MSS yaralanması ya da hastalığı sonrası akson onarılmasını arttırmak için fırsatlar sunabileceği düşünülmektedir.

2.5.1.4. Polisialik Asitler

Beyinde, PSA öncelikle nöral hücre adhezyon molekülünün (NCAM) üzerinde ifade edilir (Acheson et al., 1991; Tomasiewicz et al., 1993; Cremer et al., 1994). NCAM hücre adezyon, akson hedefleme ve fasikülasyon, nöronal göç, sinaptik değişim ve sinaptogenez gibi süreçlerin düzenlenmesinde, hem sinir sisteminin gelişimi hem de hafıza oluşumunda kritik bir rol oynar (Tomasiewicz et al., 1993; Cremer et al., 1994,1997,1998,2000; Muller et al., 1996; Becker et al., 1996; Hu et al., 1996; Seki and Rutishauser, 1998; Bruses and Rutishauser, 2001). PSA-NCAM çok miktarda embriyonik beyinde ifade edilir (Wood et al., 1997; Uryu et al.,1999; Butler et al., 1998) ve yetişkin beynindeki hipokampus, koku ampulü (burun soğanı, olfactory bulb), hipotalamus gibi yüksek derecede değişim ve nörojenezi sağlayan alanlarda bulunmaktadır (Theodosis et al., 1991; Seki and Arai, 1993; Kuhn et al., 1996; Alonso et al., 1997).

PSA'nın fonksiyonu altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, PSA'nın homofilik NCAM-NCAM etkileşimlerini azaltarak hücre-hücre adezyonunu ayarladığı düşünülmektedir. Karbonhidrat zincirinin geniş yapısal yığını ve hidrasyon kabuğu birbirine yakın hücreler boyunca trans NCAM-NCAM etkileşimleri azaltarak, hücreler arası alanı 10-15 mikron kadar artırmaktadır (Yang et al., 1992). Buna ek olarak, PSA NCAM ile hipokampal sinaps oluşumu ve yeniden modellenmesi ile ilgili heparan sülfat proteoglikanları gibi diğer proteinler ile etkileşimleri ayarlamaktadır (Dityatev et al., 2004). NCAM üzerindeki PSA zincirleri de bazı nöropsikiyatrik hastalıklarda rol oynadığı ileri sürülmüştür. Örneğin, PSA-NCAM ifadesi anlamlı derece şizofrenik hastaların hipokampusunda azalmakta ve hastalık ile ilişkili karmaşık bulgulara katkıda bulunabilmektedir (Barbeau et al., 1995). Ayrıca, PSA, PSA-NCAM-pozitif granül hücrelerinin Alzheimer hastalarının hipokampusundaki artıştan ve PSA-pozitif fibril düzensizliği ile ilişkili olduğu gibi, Alzheimer hastalığının etiyolojisinden sorumlu tutulmuştur (Mikkonen et al., 1999). Son olarak, PSA'nın NCAM-bağımsız mekanizmalar aracılığıyla nöronal fonksiyonu düzenleyebileceği düşünülmektedir. Örneğin, PSA'nın sinaptik aktarım içinde yer alan bir iyonotropik glutamat kanalı olan NMDA reseptörünün rekabetçi bir antagonisti olarak rol oynadığı (Nakanishi, 1994) ve böylece

glutamat kaynaklı sitotoksiteyi önlediği öne sürülmektedir (Hammond et al., 2006). Sialik asit içeren glikanların ilginç rollerine rağmen, beyinde onların çeşitli fonksiyonları altında yatan moleküler mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir.

2.5.2. α -L-Fukoz

2.5.2.1. Yapı ve Biyosentezi

α -L-Fukoz (6-deoksi-L-galaktoz; Fuc) genellikle N- ve O-bağlı glikoproteinlerin ve glikolipidlerin bir terminal monosakkariti olarak ifade edilir. Bu nedenle, genellikle proteinler için önemli bir moleküler tanıma elemanı olarak görev yapar. Fukoz doğal olarak ortaya çıkan diğer şekerlerden farklıdır, çünkü L-konfigürasyonunda olan mevcut tek deoksiheksoz şekerdir.

Fukozile glikanların yapısal olarak farklı bir dizisinde fukozun genellikle glikokonjugatlardaki sondan bir önceki galaktozun C-2, C-3, C-4 ya da C-6 pozisyonlarına ya da N-bağlı glikan kalıntılarının çekirdek GlcNAc'ına bağlandığı belirlenmiştir (Becker and Lowe, 2003). O-fukozilasyon, serin ve treonin kalıntılarının fukoz tarafından doğrudan değiştirilmesi, hücre büyümesi ve farklılaşmasıyla ilişkili bir protein olan Notch gibi glikoproteinlerin epidermal büyüme faktörü (EGF) tekrarları üzerinde gözlenmiştir (Moloney et al., 2000b). Fukoz N-bağlı ve O-bağlı glikanlarda uzatılmasa da, O-fukoz diğer şekerler ile uzayabilir (Becker and Lowe, 2003).

Fukozlu glikanların yapısal çeşitliliği göz önüne alındığında, bir düzineden fazla farklı insan enzimlerinin fukoz bağlarının oluşumu ile ilgili olması şaşırtıcı değildir (Becker and Lowe, 2003). İki enzim, FUT1 ve FUT2, *Fuc α 1-2Gal* glikanlarının senteziyle ilişkilidir, ve bu yapı bir epitop olarak ABO kan grubu antijenleri üzerinde bulunması (Larsen et al., 1990; Lowe, 1993; Kelly et al., 1995) yanısıra ayrıca sinaptik değişime katkıda bulunmaktadır (Rose and Jork, 1987; Jork et al., 1991; Murrey et al., 2006). *Sec1* olarak adlandırılan *FUT1* ve *FUT2*'ye homolog bir gen, açık okuma çerçevelerini bozan çeviriyle ilgili çerçeve kaymaları ve stop kodonu içermekte ve böylece bir yalancı gen (pseudogen) olarak gözükmemektedir (Kelly et al., 1995). FUT3 α 1,3 ve α 1,4 fukozlu glikanların

sentezini katalizler ve bir oligosakkarit zincirindeki Gal ve GlcNAc'lara fukoza bağlamaktadır. FUT4-7 ise sadece α 1,3 fukoza glikanları şekillendirmektedir (Natsuka and Lowe, 1994; Kaneko et al., 1999). FUT8 ve FUT9, Fuc α 1,6GlcNAc yapılarını oluşturmaktadır. FUT8 genellikle bu yapının N-bağı oligosakkaritlerin çekirdek asparajin kalıntısına tutturulmasını (Miyoshi et al., 1999), FUT9 ise bu yapının polilaktozamin zincirlerinin distal GlcNAc'ine tutturulmasını katalize etmektedir (Nishihara et al., 1999). Hiçbir işlevsel çalışma henüz yapılmış olmasına rağmen, FUT10 ve FUT11 dizi homolojisine göre α 1,3 fukoza glikanları sentezledikleri farzedilen fukoziltransferazlar oldukları rapor edilmiştir (Becker and Lowe, 2003). Son olarak, O-fukoziltransferaz 1 ve O-fukoziltransferaz 2 olarak da bilinen POFUT1 ve POFUT2'nin epidermal büyüme faktörü tekrarları içindeki serin ve treonin kalıntılarının doğrudan fukozilasyonunu katalizlemektedir (Wang et al., 2001; Luo et al., 2006).

2.5.2.2. Nörobiyolojik Fonksiyonları

Fukoza glikanlar lökosit adezyonu (Lowe, 1997; Springer, 1994), konak-bakteri etkileşimleri (Guruge et al., 1998; Hooper and Gordon, 2001), ve nöron gelişimi (Li et al., 2003; Sasamura et al., 2003) de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Belirli kan tiplerini ayırt eden ABO kan grubu antijenlerini oluşturan eritrositlerin glikolipitleri üzerinde yaygındırlar (Lowe, 1993). Fukoza glikokonjugatların normal olmayan ifadesi kanser (Thompson et al., 1992; Yazawa et al., 1993; Wang et al., 1995; Block et al., 2005), inflamasyon (Springer, 1994; Butcher and Picker, 1996; Vestweber and Blanks, 1999; Lowe, 2003) ve neoplastik süreçlerle (Macartney, 1987; Listinsky et al., 1998) ilişkili olmuştur. Örneğin, fukoza antijenler, sialil LewisX, sialil LewisY ve sialil LewisB, bazı kanserlerde "upregüle" olmakta ve ileri tümör gelişmesi ve klinik kötüleşme ile ilişkili bulunmuştur (Miyake et al., 1992; Kim and Varki, 1997; Kim et al., 1998; Orntoft and Vestergaard, 1999). Ayrıca, fukoza eksikliği insanlarda lökosit adezyon eksikliği tip II (LAD II) olarak da bilinen glikozilasyon tip IIC'nin doğuştan bir hastalığına yol açar. Bu bozukluk lökosit-vasküler epitel etkileşimlerin zayıflaması ile sonuçlanır ve immün yetmezlik, gelişim bozuklukları, psikomotor zorluklar, ve zihinsel yetenek bozuklukları ile birlikte görülür. Beyindeki rolleri az anlaşılmış olmasına rağmen,

fukozlu glikanların sinir gelişimi, öğrenme ve belleği etkilediği bilinmektedir (Yakubenia and Wild, 2006).

Fukozun nöral gelişimde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. O-fukozilasyon, gelişme esnasında hücre kaderinin geniş çapta belirlenmesini kontrol eden bir zara gömülü reseptör olan Notch protein aktivitesi için gereklidir (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Okajima and Irvine, 2002; Lei et al., 2003; Haines and Irvine, 2003; Rampal et al., 2005). Çalışmalar fukozun Notch sinyalleme protein içinde bir katlanma değişikliğini teşvik ederek ya da Notch ligandları ile doğrudan etkileşime girerek ayarladığını göstermektedir (Haines and Irvine, 2003). Notch sinyalinin nöronal soy sürdürülmesi (neuronal progenitor maintenance) ile ilişkili olduğuna ve nöronal ve glial soylar arasındaki hücre kaderi kararını yönettiğine inanılmaktadır. Ayrıca, Notch sinyali farklılaşmış nöronların davranışına ve nöronal göçe katkıda bulunabilir (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). *POFUT1* geninin genetik silinmesi farelerde embriyonik dönemde ölümcüldür ve anormal vaskülogenez, somitogenez ve nörogenezi içeren Notch reseptör silinmesi üzerinde görülenlere benzer gelişimsel kusurlara neden olur (Shi and Stanley, 2003; Lu and Stanley, 2006). Bu çalışmalar sinir gelişiminde fukozun önemini göstermekte ve Notch fukozilasyonu bu olayların önemli bir arabulucusu olarak içinde yer almaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışma Materyali

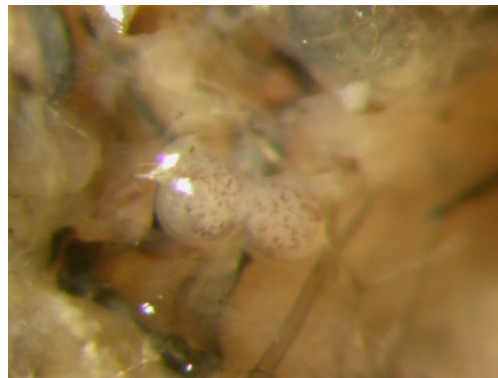
Monosakkarit değişikliklerinin gelişim ve yaşlanma sürecindeki değişikliklerini belirlemek için kullanılan deney materyali model bir organizma olan ipekböceği (*Bombyx mori* L.)'dir (Şekil 3.1). Çalışma materyalinin ipekböceği olarak seçilmesinin nedeni; böceğin ana besini olan dut yapraklarında sialik asit bulunmayışı, genomu kısmen sekanslanmış model bir organizma aday olması ve çalışılması kolay ve büyük bir böcek olmasıdır. İpekböceği yumurtaları her senenin nisan ayı başında Bursa Kozabirlik'den (S.S. Bursa Koza Tarım Satış Kooperatifleri Birliği) temin edilmiştir. Yaşlanmaya ve gelişmeye bağlı monosakkarit ve sialik asit değişiklikleri ipekböceği ip merdiven sinir sistemi ve beyin ganglionlarında incelenmiştir (Şekil 3.2 ve 3.3).



Şekil 3.1: İpekböceği Evreleri (1x büyütme) (Orig.)



Şekil 3.2: Larval İp Merdiven Sinir Sistemi(10x)
(Orig.)



Şekil 3.3: Larval İpekböceği Beyni (10x)
(Orig.)

3.1.1. Çalışma Materyalinin Yetiştirilmesi

İpekböceği yumurtaları temin edildikten sonra yumurtadan çıkmaları için petri kapları içerisine yerleştirilmiş filtre kağıtları üzerine bölüm bölüm konularak karanlıkta 24 °C’de bırakılmıştır. Yaklaşık 10-12 gün sonra açılan yumurtalardan çıkan larvalar (Şekil 3.4), 3.evre larva dönemine kadar petri kapları (Şekil 3.5) içinde Çizelge 3.1’de belirtilen uygun sıcaklık ve nem şartlarında büyütülmüştür (Parlak, 2001). 3.evre larva döneminden sonra ise büyük plastik kapların içerisine yerleştirilerek evrelere özgü sıcaklık ve nem şartlarında yetiştirilmiştir (Şekil 3.6). Koza örme dönemine giren ipekböceği larvaları koza örmelerini kolaylaştırmak amacıyla başka plastik kaplara alınmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.4: Yumurtadan Yeni Çıkmış İpekböceği Larvaları (1x büyütme) (Orig.)



Şekil 3.5: Petri Kapları İçerisinde Yetiştirilen İpekböceği Larvaları (Orig.)



Şekil 3.6: Büyük Plastik Kaplarda Yetiştirilen İpekböceği Larvaları (Orig.)



Şekil 3.7: Koza Örme Kapları (Orig.)

Çizelge 3.1: Sıcaklık-Rutubet Tablosu

Yaş	Nem (%)	Isı(⁰ C)
1	80-85	26-28
2	80-85	26-28
3	75-80	24-26
4	70-75	23-24
5	70-75	23-24

İpekböcekleri ana besinleri olan dut yapraklarıyla beslenmiştir (Şekil 3.8). Mikroorganizmalardan kaynaklanabilecek dış kontaminasyonu uzaklaştırmak için dut ağaçlarından toplanan yapraklar çeşme suyuyla iyice yıkanarak temizlenmiş daha sonra kağıt havlularla kurutulmuştur. Beslemeler günde 3 kez sabah, öğle, akşam olacak şekilde yapılmıştır.



Şekil 3.8: Dut Ağacından Yaprak Toplarken (Orig.)

3.1.2. Sinir Sisteminin Diseksiyonu

İpekböceğinin merkezi sinir sistemi elemanları; dorsalde beyin ganglionları ile ventralde subösefageal ganglionla başlayan ip merdiveni oluşturan ganglion ve konnektiflerdir. İp merdiven sinir sistemi ve beyin ganglionları, farklı gelişme evreleri ile yaşlanmayı temsil etmesi açısından 3.evre, 5.evre, hareketsiz prepupa ve 14 günlük pupa dönemlerinden disekte edilmiştir. Genç evreleri temsil eden 3. ve 5.evrelerden alınan örnekler, deri değişimini izleyen 1.gün içinde disekte edilmiştir. Yaşlı larval örneği temsil eden hareketsiz prepupa dönemi örnekleri, koza örümünü izleyen 1.gün içinde henüz pupal evreye deri değiştirmemiş larvalardan disekte edilmiştir. Ergin yapılanmanın tamamlandığı örnek olarak pupa döneminde koza örümünü izleyen 14.gün disekte edilmiştir.

Diseksiyon işlemi Carl Zeiss stereomikroskop altında zeminleri parafin kaplı petri kapları içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9). Çalışmalar için kullanılacak dokular her analiz metoduna yönelik uygun saklama solüsyonları konulmuş ependorflarda saklanmıştır.



Şekil 3.9: Diseksiyon İşlemi Yapılan Stereomikroskop ve Parafin Kaplı Petri (Orig.)

CapLC-ESI-MS/MS analizleri için disekte edilen örnekler ependorfların daraları alındıktan sonra metanol (Sigma Aldrich) içinde saklanmış, FITC işaretli lektinlerle şekerlerin belirlenmesi için örnekler PBS (0,01 M Fosfat, pH:7,2) içinde %4'lük paraformaldehit (Merck) içine aktarılmıştır. SDS-PAGE ve PAS boyama yöntemi için örnekler PBS içine aktarılmıştır. Uygun saklama tamponlarına aktarılan örnekler yöntemlere uygun saklama koşullarında saklanmıştır. CapLC-ESI-MS/MS analizi ve SDS-PAGE-PAS boyama yöntemi için alınan örnekler -80 °C'de, FITC işaretli lektinlerle işaretlemeler için alınan örnekler +4 °C'de analiz edilene kadar saklanmıştır.

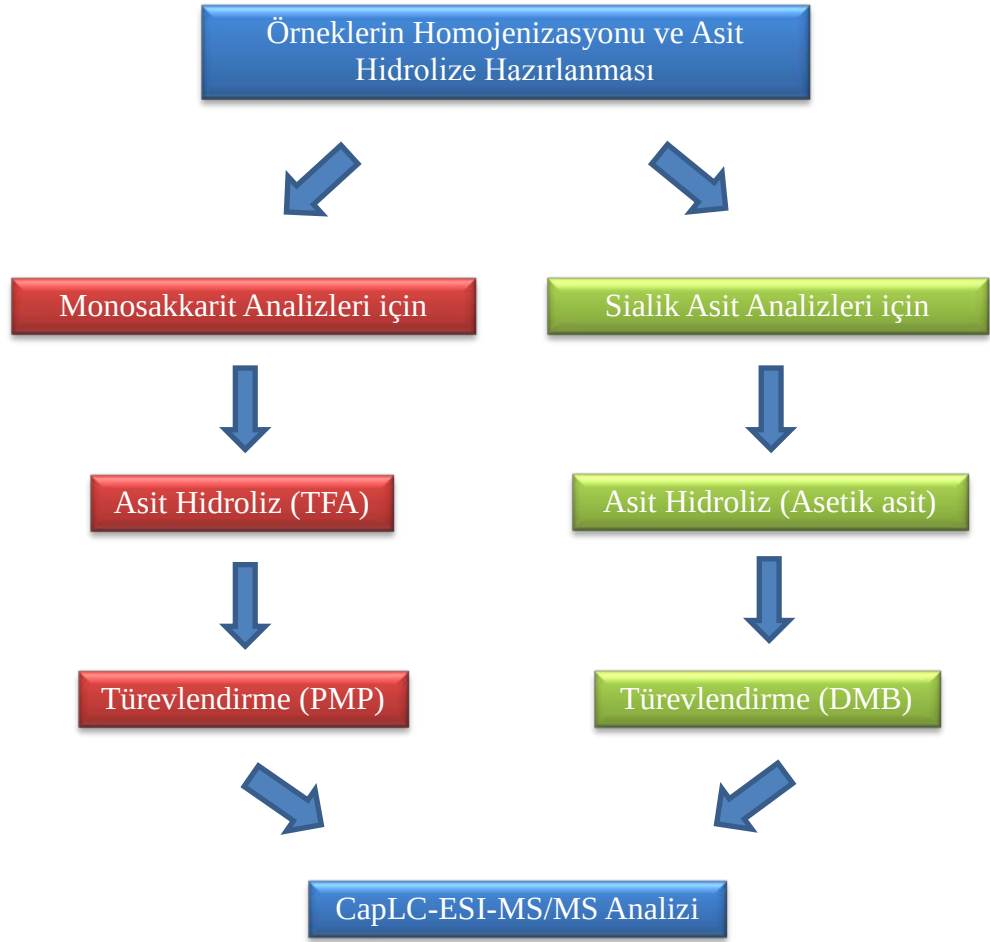
3.2. Metod

İpekböceği sinir sisteminde yaşlanmaya ve gelişime bağlı monosakkarit değişiklikleri yapısal şekerler olan ve glikoproteinlerin ve glikolipitlerin yapı elemanları olan sialik asit (Sia), glukoz (Glc), galaktoz (Gal), mannoz (Man), N-asetilglukozamin (GlcNAc), N-asetilgalaktozamin (GalNAc), ksiloz (Xyl), arabinoz (Ara), riboz (Rib) ve fukoz (Fuc) baz alınarak belirlenmiştir. Sialik asit değişikliklerinin belirlenmesi temel sialik asit olan N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac) baz alınarak gerçekleştirilmiştir.

Monosakkaritlerin ve sialik asitlerin gelişim ve yaşlanma boyunca değişikliklerinin belirlenmesi için üç farklı analiz metodu kullanılmıştır. Bunlar CapLC-ESI-MS/MS (Capillary Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) sistemi ile belirleme, FITC (Fluorescein isothiocyanate) işaretli lektinlerle histokimyasal belirleme ve SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) yönteminde Coomassie Mavisi boyama ile proteinleri, PAS (Periodic Acid-Schiff) boyama ile glikoproteinleri belirlemedir.

3.2.1. CapLC-ESI-MS/MS Analizi ile Belirleme

Sialik asit ve monosakkarit değişikliklerinin CapLC-ESI-MS/MS sistemi (Şekil 3.11) (Agilent 1200, Bruker Daltonics Esquire 6000) ile belirlenmesi analizi, analiz edilecek şekerlerin kimyasal yapı ve özelliklerinin farklı olması dolayısıyla iki farklı türevlendirme yöntemi ile yapılmıştır. Sialik asit analizi için DMB (4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma Aldrich) türevlendirme yöntemi kullanılmıştır (Klein et al., 1997; Morimoto et al., 2001). Monosakkarit analizleri için ise PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, Sigma Aldrich) türevlendirme yöntemi (Zhang et al., 2003) kullanılmıştır. Her iki türevlendirme yönteminde asit hidroliz işlemine kadar olan basamaklar tamamen aynıdır. Asit hidroliz işleminden itibaren devam eden basamaklar farklıdır. Çünkü sialik asit ile diğer monosakkaritlerin hidroliz hassasiyetleri farklıdır. CapLC-ESI-MS/MS analizi ile yaşlanma sürecinde sialik asit ve monosakkaritlerin değişikliklerinin belirlenmesi uygulama basamakları Şekil 3.10'da şematize edilmiştir.



Şekil 3.10: CapLC-ESI-MS/MS Analizi Uygulama Basamakları



Şekil 3.11: Analizlerin Yapıldığı CapLC-ESI-MS/MS Sistemi (Orig.)

3.2.1.1. Örneklerin Homojenizasyonu ve Asit Hidrolize Hazırlanması

-80 °C’de metanol içindeki ip merdiven sinir sistemi ve beyin dokuları kademeli olarak oda sıcaklığına düşürüldükten sonra homojenizasyonları homojenizatör (Heidolph, Silent Crusher S) ile ependorf buz içinde olacak şekilde homojenize edilmiştir (Şekil 3.12). Örneklerin içinde bulundukları metanol manyetik karıştırıcı üzerinde azot gazı altında ependorflardan uçurulmuştur (Şekil 3.13). Metanol tamamen uçuktan sonra ependorftaki örneklerin kuru ağırlıkları ölçülmüştür.



Şekil 3.12: Homojenizasyonun Yapıldığı Homojenizatör (Orig.)



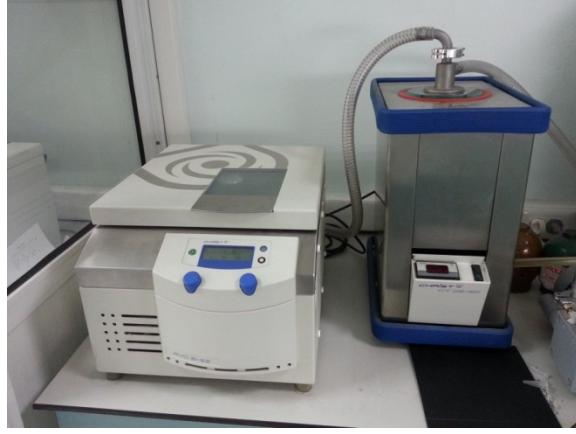
Şekil 3.13: Solüsyonların Azotla Uçurma İşlemlerinin Yapıldığı Düzenek (Orig.)

3.2.1.2. Monosakkarit Analizi İçin Asit Hidrolizi

Monosakkarit analizi için standart olarak kullanılan Glukoz (EY Laboratories), Galaktoz (EY Laboratories), N-asetilgalaktozamin (GalNAc, Sigma Aldrich), N-asetilglukozamin (GlcNAc, EY Laboratories), Mannoz (Merck), Ksiloz (Difco Laboratories), Arabinoz (Difco Laboratories) monosakkaritleri ultra

saf su içinde 1000 ppm (1 mg/ml) olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra bu örnekler doğrudan türevlendirmeye alınmıştır.

İpekböceği sinir sistemi örnekleri içinse, 4 farklı evre örneklerinin kuru ağırlıklarının miligramı başına 30 µl 4 N TFA (Trifloroasetik asit, Sigma Aldrich) ilave edilmiştir. Ardından, TFA'ları ilave edilmiş örnekler önceden 100 °C'ye ayarlanmış etüv (Binder, ED 53) içinde 4 saat 100 °C'de asit hidrolize bırakılmıştır. Hidroliz aşamasından sonra TFA, vakumlu konsantratörde (Martin Christ, RVC 2-25) 30°C'de ependorftan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.14). Uçurma işleminden sonra TFA'nın iyice uzaklaştırılması için 200 µl metanol ilave edilerek tekrar uçurulmuştur.



Şekil 3.14: Vakumlu Konsantratör (Orig.)

3.2.1.3. Sialik Asit Analizi için Asit Hidrolizi

Sialik asit standardı olarak N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac, Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Neu5Ac 1 ppm olarak hazırlanmış ve daha sonra türevlendirme işlemine geçilmiştir.

İpekböceği sinir sistemi örnekleri içinse, 4 farklı evre örneklerinin kuru ağırlıklarının miligramı başına 5 µl 2 M asetik asit (Sigma Aldrich) ilave edilmiştir. Ardından, asetik asit edilmiş örnekler önceden 80 °C'ye ayarlanmış etüv içinde 3 saat 80 °C'de asit hidrolize bırakılmıştır.

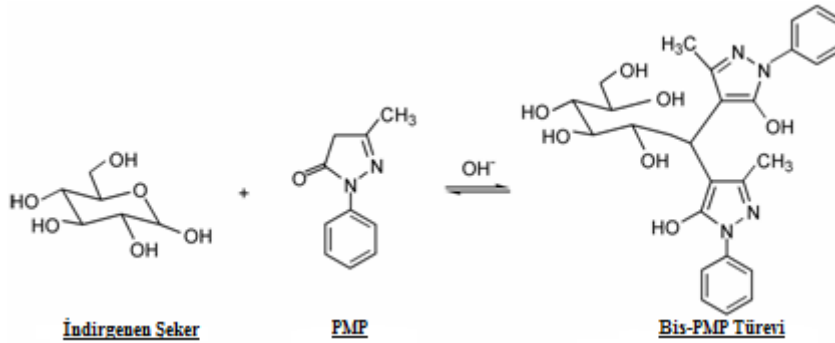
3.2.1.4 Tekrar Asetillendirme (Reasetilasyon)

Monosakkarit değişiminin belirlenmesi analizleri için, asetillenmiş monosakkaritlerin asit hidroliz işleminden sonra hidroliz esnasında kopan asetil

gruplarının tekrar şekerlere geri bağlanması gerekmektedir. Bu amaçla TFA'leri uçurulmuş örneklerin üzerine sodyum karbonat (pH:9,5) (Horasan Kimya) ve asetik anhidrit (Sigma Aldrich) ilave edilerek yarım saat oda sıcaklığında örnekler bekletilmiş ve şekerlerin tekrar asetillenmesi sağlanmıştır.

3.2.1.5 Monosakkarit Analizi için PMP ile Türevlendirme

Asitleri uçurulan örneklerin üzerine metanolde hazırlanmış 0,5 M PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, Sigma Aldrich) (Şekil 3.15) ile 0,3 M NaOH (Sodyum Hidroksit, Sigma Aldrich) ilave edilmiştir. 1 saat 70°C 'de etüvde bekletildikten sonra, örneklerin üzerine 0,1 M HCl (Hidroklorik Asit, Riedel-de Haen) ilave edilmiştir. İyice çalkalandıktan sonra üzerine kloroform (Riedel-de Haen) ilave edilmiştir. İyice çalkalanıp vortekslendikten sonra 3000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra üst faz temiz ependorflara alınmıştır. CapLC-ESI-MS/MS analizi için örnekler viallere aktarılmış ve analiz edilmiştir.



Şekil 3.15: PMP ve Monosakkarit Reaksiyonu (Anonim)

3.2.1.6. Sialik Asit Analizi için DMB ile Türevlendirme

Asit hidroliz işleminden sonra örnekler 10000 rpm'de 2-3 dakikalık kısa bir santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatant yeni bir ependorfa alındıktan sonra bu süpernatanttan 40 µl alınarak yeni bir temiz ependorfun içinde 40 µl DMB türevlendirme karışımı (merkaptotanol, sodyum hidrosülfid, DMB) ile karıştırılmıştır. Örnekler iyice karıştırıldıktan sonra önceden 60 °C'ye ayarlanmış etüv içersinde 2,5 saat türevlendirme işlemine bırakılmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16: Sialik Asit ve DMB Reaksiyonu (Anonim)

Türevlendirme işleminden sonra örnekler 15000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant partikülsüz biçimde vialler içindeki insertlere aktarılmış ve analiz için CapLC-ESI-MS/MS'e verilmiştir.

3.2.1.7. CapLC-ESI-MS/MS Analizi

Sialik asit ve monosakkarit değişiklikleri ters faz kolon (ACE 5 C18 150 x 0.5 mm 5 µm) ve Agilent 1200 seri kapiler HPLC sistemi ile analiz edilmiştir. Elüsyon monosakkarit analizi için asetonitril-su kullanılarak, sialik asit analizi için metanol-asetonitril-su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz akışı 20 µl/dk ve kolon sıcaklığı oda koşulları olarak belirlenmiştir. Toplam analiz süresi, sialik asit analizleri için 25 dakika, monosakkarit analizleri için 60 dakika olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi, monosakkarit analizi için 0,1 µl, sialik asit analizi için de 0.5µl'dir. Örnekler soğutmalı otomatik örnekleyicide 5°C'de bekletilerek analiz edilmiştir.

Kolon sonrası kütle dedeksiyonu Bruker HCT Ultra Ion Trap LC-MSⁿ ile yapılmıştır. Nebulizer gaz basıncı 15 psi, kurutucu gaz (dry gas) 5 L/dk ve kurutucu gaz sıcaklığı 300 °C olarak kaydedilmiştir. Sistem iyon optik voltajları smart tune kullanılarak tayin edilmiştir. Analiz, pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. FITC İşaretli Lektinlerle Belirleme

Gelişmeye ve yaşlanmaya bağlı monosakkarit ve sialik asit değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla FITC işaretli lektinler olan LFA, MAA, SNA, PSL (EY Laboratories) kullanılmıştır (Deveci ve ark., 2010). Bu lektinler sadece oligosakkarit dizilerinde uçtaki monosakkaritleri değil aynı zamanda altındaki şekerleri ve bağlanma tiplerini de tanımaktadır. Kullanılan lektinlerin tanıdığı şekerler ve bağ tipleri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: Kullanılan Lektinler ve Tanıdıkları Bağ Tipleri (EY Labs., 2007)

Lektin Simgesi	Lektin Açık Adı	Tanıdığı monosakkarit ve bağ tipi
LFA	<i>Limax flavus</i> aglutinin	NANA
MAA	<i>Maackia amurensis</i> aglutinin	NANA α 2,3Gal
SNA	<i>Sambucus nigra</i> aglutinin	NANA α 2,6Gal/GalNAc
PSL	<i>Polyporus squamosus</i> aglutinin	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc...-N

1 mg/ml konsantrasyonda olan lektinler 20 mikrolitre olacak şekilde alikotlanmış ve ardından 1:100 seyreltilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Uygulamalarda lektinler 1:100 seyreltik halleriyle kullanılmıştır.

3.2.2.1. Disekte Edilmiş Örneklerin Lowicryl HM20 Gömme Ortamına Gömülmesi

FITC-işaretli lektinlerle yaşlanma ve gelişim sürecinde şeker değişiklikleri beyin ganglionlarında izlenmiştir. Örneklerin diseksiyon işlemi sırasında, FITC işaretleme için örnekler %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu içine alınmıştır. Tespit solüsyonu içindeki örnekler stereomikroskop altında incelenerek uygun şekilde gömme kapsülleri içine yerleştirilmiştir. Daha sonra gömme serileri geçilerek beyin dokuları lowicryl HM20 gömme ortamına gömülmüştür (Deveci ve ark., 2010).

Gömülen örnekler daha sonra kesitleri alınmak üzere oksijenden zarar görmemeleri için azot gazıyla doldurulmuş kaplar içine aktararak saklanmıştır.

3.2.2.2. Kapsüllerdeki Örneklerden Kesit Alınması

FITC-işaretli lektinlerin örneklerle yüzleştirilmesi için kapsüllerdeki örneklerden ultramikrotom (American Optical Corporation, C.Reichert Austria (OM u3)) (Şekil 3.17) yardımıyla 0,75 mikronluk kesitler cam bıçaklarla alınmış ve polilizinle kaplı lamalar üzerindeki su damlacıklarına aktararak ısıtıcı tablada sabitlenmiştir. Her örneğin incelenecek bölgesinin doğruluğu, toluidin mavisi boyası ile boyama işlemi yapılarak kontrol edilmiştir.



Şekil 3.17: Kesit Alınan Ultramikrotom (Orig.)

3.2.2.3. Kesitlere FITC-İşaretli Lektinlerin Uygulanması

Polilizinli lamalar üzerindeki kesitlere her örnek için belirlenmiş 4 farklı FITC-işaretli lektin uygulanmıştır. Alınan 0,75 μm 'lık kesitler lektin çeşidine göre PBS veya TBS ile yıkandıktan sonra bloklama tamponuna alınıp ardından aynı tamponda hazırlanmış olan FITC işaretli lektinlerle oda sıcaklığında ve nemli odacıkta inkübe edilmiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18: Nemli Odacıklı Lam Taşıyıcısı (Orig.)

Her uygulama sonrası lamalar gliserin ile kapatılıp floresan mikroskop (Leica DM 4000B) altında incelenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19: Bilgisayara Bağlı Mikroskop-Kamera-Motorize Stage Sistemi (Orig.)

3.2.3. SDS-PAGE Yöntemiyle Belirleme

4 farklı ipekböceği evresinden disekte edilen beyin ganglionları ve ip merdiven sinir sistemi dokuları, SDS-PAGE yöntemi ile protein boyutlarının belirlenmesi (Chrambach et al., 1967, Bollag et al., 1996) ve ardından glikoprotein miktarlarının gösterilmesi (Doerner and White, 1990) amacıyla PBS (0,01 M fosfat tamponu, pH:7,2) içine alınmıştır.

3.2.3.1. Örneklerin Homojenizasyonu ve Protein İzolasyonu

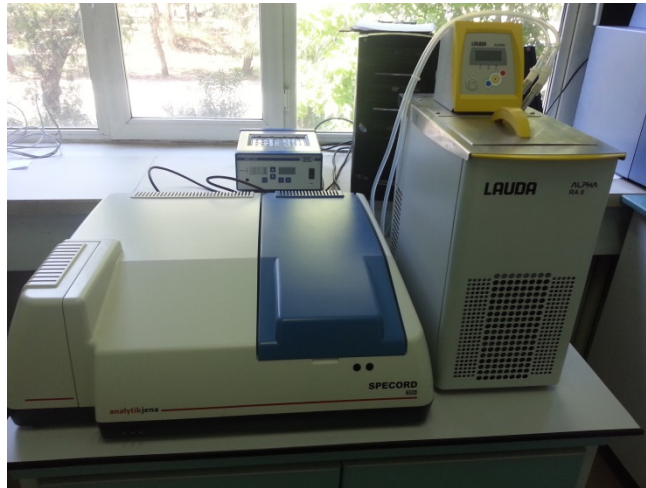
PBS içindeki 4 evreye ait doku örnekleri homojenizatör ile 30'ar saniye aralıklarla hücre içeriğinin açığa çıkması için buz üzerinde parçalanmıştır. Homojenizasyondan sonra, proteolitik enzimleri bloke etmek için 1 µl %10'luk PMSF (Fenilmetilsulfonyl florid, Applichem) ve 1 µl proteaz inhibitör kokteyli (Sigma Aldrich) eklenmiştir ve buz üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra dokular 10000 rpm 'de ve +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant eğer partikül yoksa 20'şer µl'lik hacimlerde alikotlanarak -80°C'lik derin dondurucuya konmuş, partikül yoğunluğu varsa tekrar aynı santrifüj işleminden geçirildikten sonra metanol/kloroform karışımı ile yağlarından ayrılarak alikotlanarak analize kadar -80°C'lik derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2.3.2. Total Protein Miktar Tayini

Total protein izolasyonundan sonra protein miktar tayinlerinin yapılması için her evreye ait 4 örnekten 50 µl alınarak 1,5 ml Bradford solüsyonu (Sigma Aldrich) ile spektrofotometre kuvvetleri içinde karıştırılarak 20 dakika reaksiyona

birakılmıştır. Bu esnada total protein miktarının belirlenmesi için standart olarak kullanılan BSA (Bovine Serum Albumin, Santa Cruz) 0,25, 0,5, 1 ve 1,4 mg/ml konsantrasyonlarda PBS içinde hazırlanmış ve Bradford solüsyonu ile aynı şekilde reaksiyona bırakılmıştır (Bradford, 1976). Reaksiyondan sonra BSA standart örnekleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbanslarla BSA standart eğri grafiği elde edilmiş ve formülize edilmiştir.

Analiz edilecek 4 evreye ait örneklerin Bradford reaksiyonundan sonra 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbansları ölçülmüştür (Şekil 3.20). Absorbanslar standart eğri grafiğinden elde edilen formüle konarak örneklerin total protein konsantrasyonları belirlenmiştir.



Şekil 3.20: Isı Kontrollü ve Bilgisayara Bağlı Spektrofotometre (Orig.)

3.2.3.3. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Yöntemi

SDS-PAGE, Mini-Protean III (Bio-Rad) elektroforez sistemi kullanılarak yapılmıştır. 1 mm kalınlıktaki cam kaset için alt (resolving-separating) jel % 7,5, üst (stacking) jel % 4 konsantrasyon olarak şekilde hazırlanmıştır (Bollag et al., 1996).

Alt jel hazırlandıktan sonra cam kaset tarağın geleceği yere kadar alt jelle doldurulmuştur (Şekil 3.21). Üzeri kasetin sonuna kadar alt jelin düzgün oluşması için saf su ile tamamlanmıştır. Kaset, 30 dakika 37 °C'de etüvde polimerizasyona bırakılmıştır.

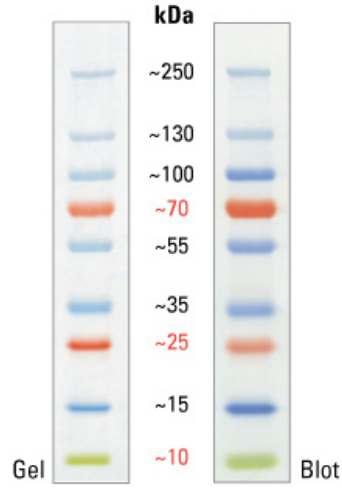


Şekil 3.21: Cam Kasetler (Orig.)

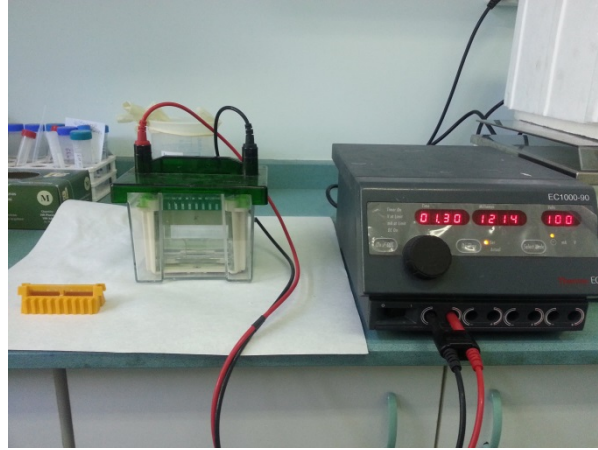
Alt jel polimerleştikten sonra üst jel hazırlanmış ve polimerize olmuş alt jel üzerine ilave edilip jel üzerinde kuyuları oluşturacak tarak kasete takılmıştır. Kaset, 30 dakika 37 °C’de etüvde polimerizasyona bırakılmıştır.

Jele yüklenecek örnek çözeltisi konsantrasyonlarına göre yükleme tamponu [(Tris-HCl, pH:6.8, gliserol, %10 SDS, % 0.5 bromfenol mavisi, ultra saf su) + beta merkaptetanol] karışımıyla seyreltilmiştir. Jele yüklenecek eşit protein konsantrasyonları en düşük protein konsantrasyonuna ait örnek baz alınarak, jele yüklenebilecek en yüksek konsantrasyonda yükleme yapılmıştır. Jele yüklenen protein konsantrasyonu 20 µg olarak belirlenmiştir. Periyodik asit-Schiff boyama için kontrol proteinler olarak BSA (glikoprotein değil) ve Fetuin (glikoprotein) seçilmiştir. Bu standart proteinlerin jelde boyanmalarına göre örneklerin glikoprotein yoğunlukları karşılaştırılmıştır. Standart proteinler 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde stoklar halinde hazırlanmış ve 20 µl’lik alikotlara ayrılmıştır. Standart proteinler daha sonra jele her kuyuda 10 µg olacak şekilde yükleme tamponu ile 1:1 (v/v) seyreltilerek yüklenmiştir.

Yükleme tamponu ilave edilen örnekler 95°C’de 5 dakika denatürasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnekler ve protein boyutlarını tahmin etmeye yarayan protein markeri (Thermo Scientific, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10-250kDa) (Şekil 3.22) kuyulara tatbik edilmiş ve Mini-Protean III elektroforez sisteminde (Şekil 3.23) 1x yürütme tamponu (Tris, Glisin, %10 SDS (w/v)) ile 100 V’da 1,5 saat yürütülmüştür (Bollag et al., 1996)



Şekil 3.22: Standart PageRuler Plus Prestained Protein Markeri (Thermo)



Şekil 3.23: Mini-Protean III Elektroforez Sistemi (Orig.)

3.2.3.4. SDS-PAGE Jelinde Yürütülmüş Proteinlerin Coomassie Mavisi ile Boyanması

SDS-PAGE işlemi ile boyutlarına ayrılmış protein karışımının görünür hale getirilebilmesi için yürütülen poliakrilamid jel % 0,25'lik coomassie mavisi ile 1 saat inkübasyona bırakılmıştır (Bollag et al., 1996). İnkübasyondan sonra jel yıkama solüsyonu ile 1 saat yıkanarak artık boyalar uzaklaştırılmış ve görüntüleme cihazında jel görüntüsü alınmıştır.

3.2.3.5. SDS-PAGE Jelinde Yürütülmüş Glikoproteinlerin Belirlenmesi

SDS-PAGE işleminden sonra yürütülen jeldeki glikoproteinlerin evrelere bağlı değişimlerinin belirlenmesi için Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama yapılmıştır (Doerner and White, 1990).

4 evreye ait örneklerin bulunduğu poliakrilamid jel, yürütülme işleminden sonra fiksasyon solüsyonuyla 1 saat oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Ardından jel 1 saat oda sıcaklığında eşitleme solüsyonuyla muamele edildikten sonra 1 saat 4 °C’de karanlıkta %1’lik periyodik asit solüsyonu içinde bekletilmiştir. Daha sonra periyodik asit kalıntıları asetik asitle bir saat boyunca 10’ar dakika aralıkla uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminden sonra önceden hazırlanmış Schiff bazı solüsyonu jele 4 °C’de karanlıkta tatbik edilmiştir. Schiff bazı uygulamasından sonra atık Schiff solüsyonu dökülerek jel % 0,5’lik sodyum metabisülfitle yıkanıp jel görüntüleme aletiyle (DNR Bio-Imaging System) jelin görüntüsü alınmıştır (Şekil 3.24).



Şekil 3.24: DNR Jel Görüntüleme Cihazı (Orig.)

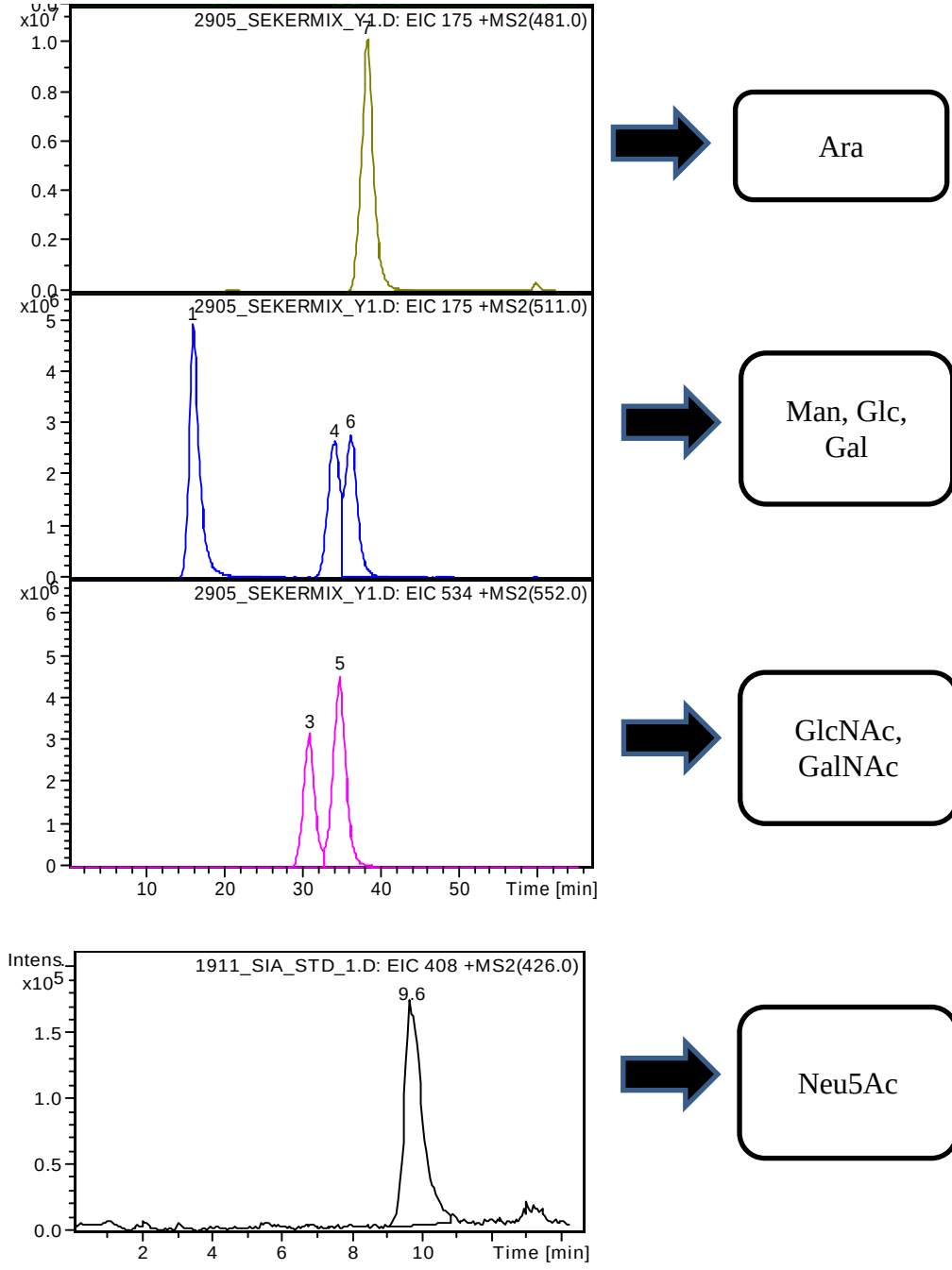
4. BULGULAR

4.1. Monosakkaritlerin Belirlenmesi

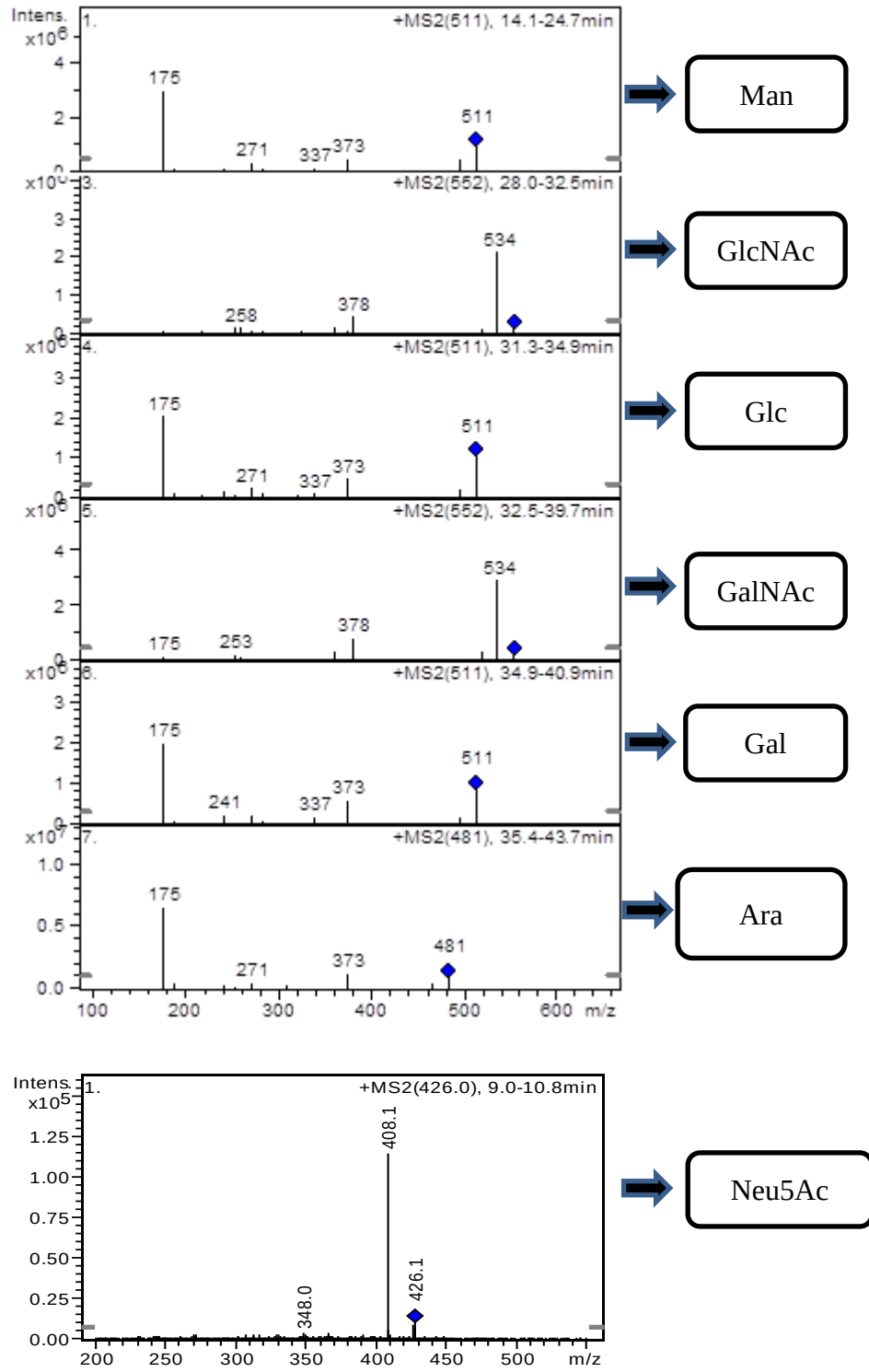
4.1.1. CapLC-ESI-MS/MS Sisteminde Monosakkarit Standartlarıyla Belirleme

Monosakkarit standartları CapLC-ESI-MS/MS cihazına verilerek standartların kolonda alıkonma zamanları ve kütleleri belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). Evrelere göre sialik asit değişikliklerinin belirlenmesi için temel sialik asit olan Neu5Ac seçilmiştir.

- Glukoz (Glc) için ana iyon 511 m/z, alıkonma zamanı 34,1 dakikadır.
- Mannoz (Man) için ana iyon 511 m/z, alıkonma zamanı 16,3 dakikadır.
- Galaktoz (Gal) için ana iyon 511 m/z, alıkonma zamanı 36,4 dakikadır.
- N-asetilglukozamin (GlcNAc) için ana iyon 552 m/z, alıkonma zamanı 30,8 dakikadır.
- N-asetilgalaktozamin (GalNAc) için ana iyon 552 m/z, alıkonma zamanı 34,7 dakikadır.
- Sialik Asit (Neu5Ac) için ana iyon 426 m/z, alıkonma zamanı 9.6 dakikadır.
- Arabinoz (Ara) için ana iyon 481 m/z, alıkonma zamanları 38,5 dakikadır.



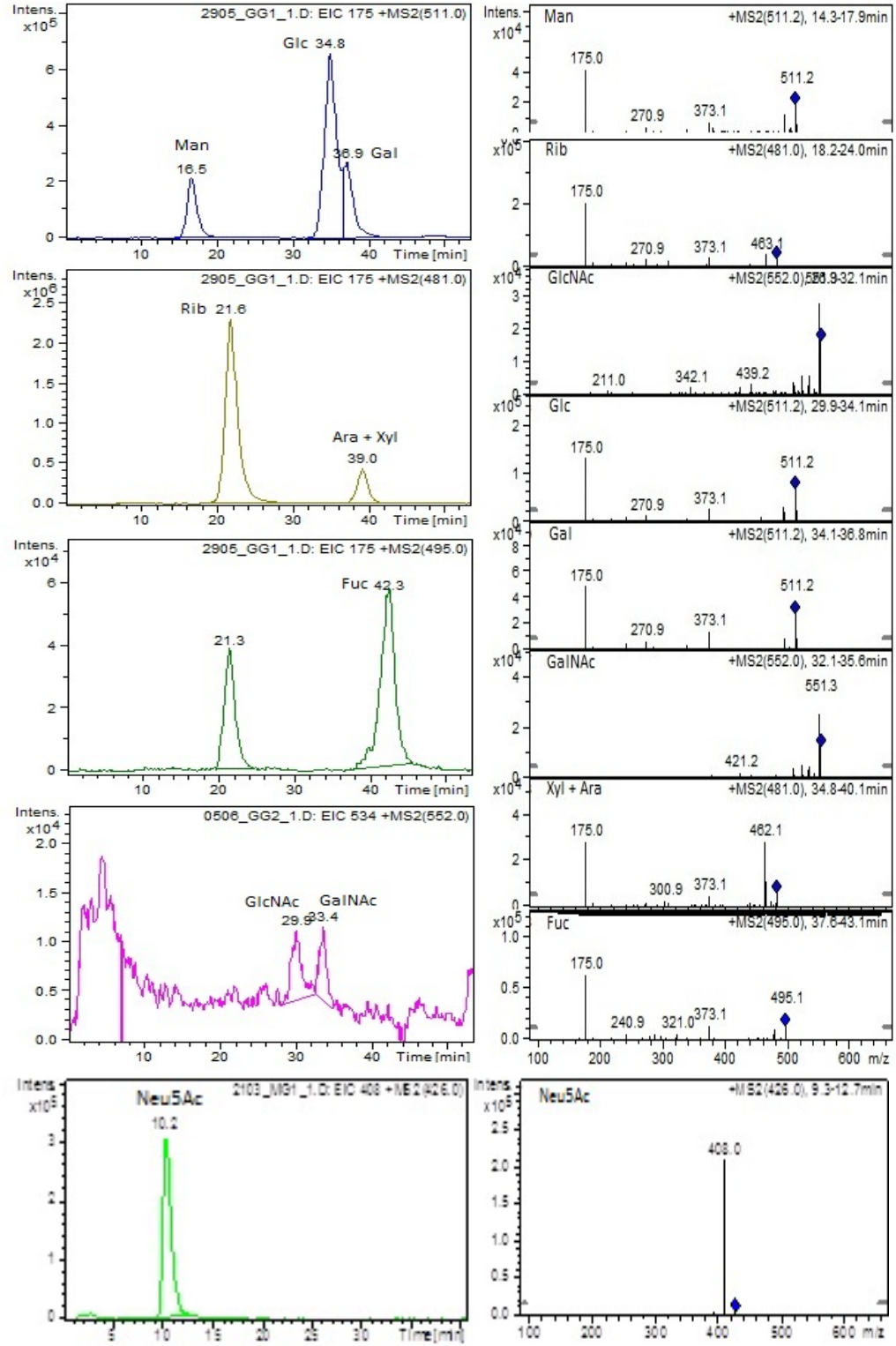
Şekil 4.1. Standart Monosakkaritlerin LC-MS Kromatogramları



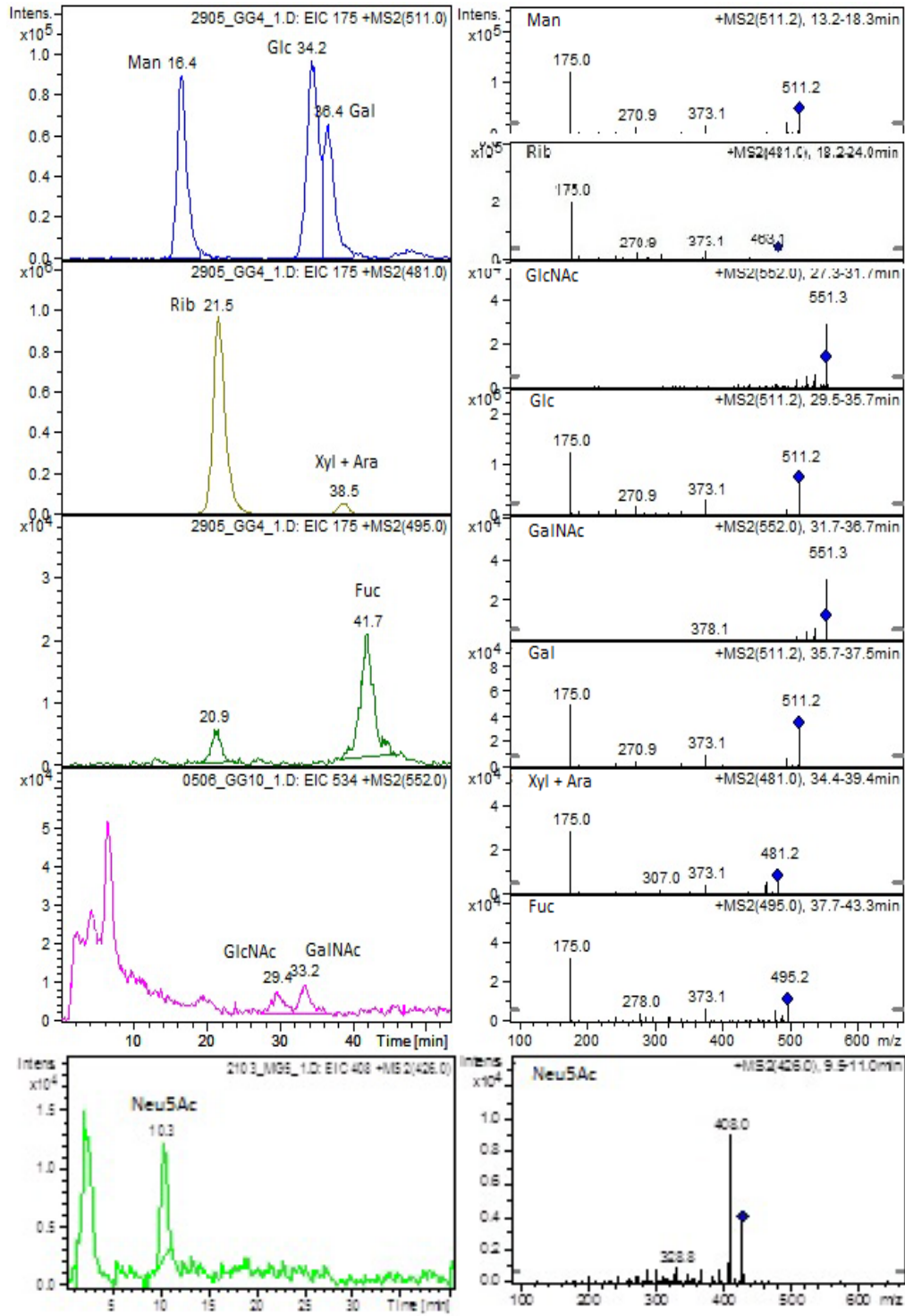
Şekil 4.2. Standart Monosakkaritlerin LC-MS Spektrumları

4.1.2. Monosakkaritlerin Evrelere Göre Değişimi

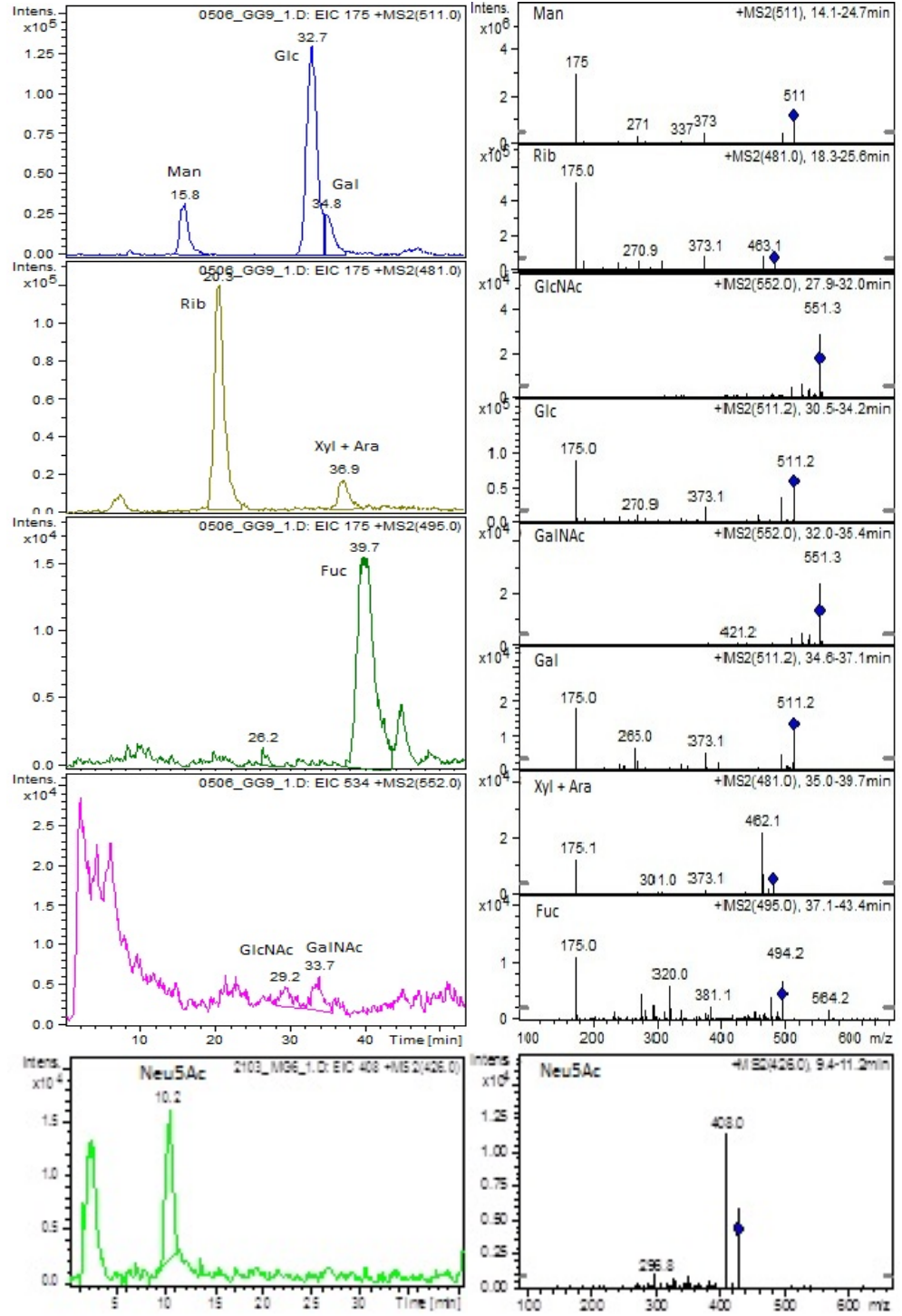
Glukoz, mannoz, galaktoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, fukoz, sialik asit, ksiloz, arabinoz ve riboz analiz edilen monosakkaritlerdir. Monosakkaritlerin seçilen dört evrede de mevcut standartlarla karşılaştırıldığında alıkonma zamanları ve kütle spektrumları aynıdır (Şekil 4.3; 4.4; 4.5; 4.6). Mutlak pik alanı karşılaştırılmalarına göre monosakkaritlerin miktarları en yüksek genç evre olarak seçilen 3.evre larva örneklerinde bulunmuştur. Gelişimin ilerlemesi ve dokuların yaşlanmasıyla orantılı olarak bu monosakkaritlerin miktarlarında dramatik bir düşüş gözlenmiştir. Pupal evrede ergin dokuların tekrar yapılanmasıyla birlikte bu monosakkaritlerin miktarlarında ufak bir artış gözlenmiştir.



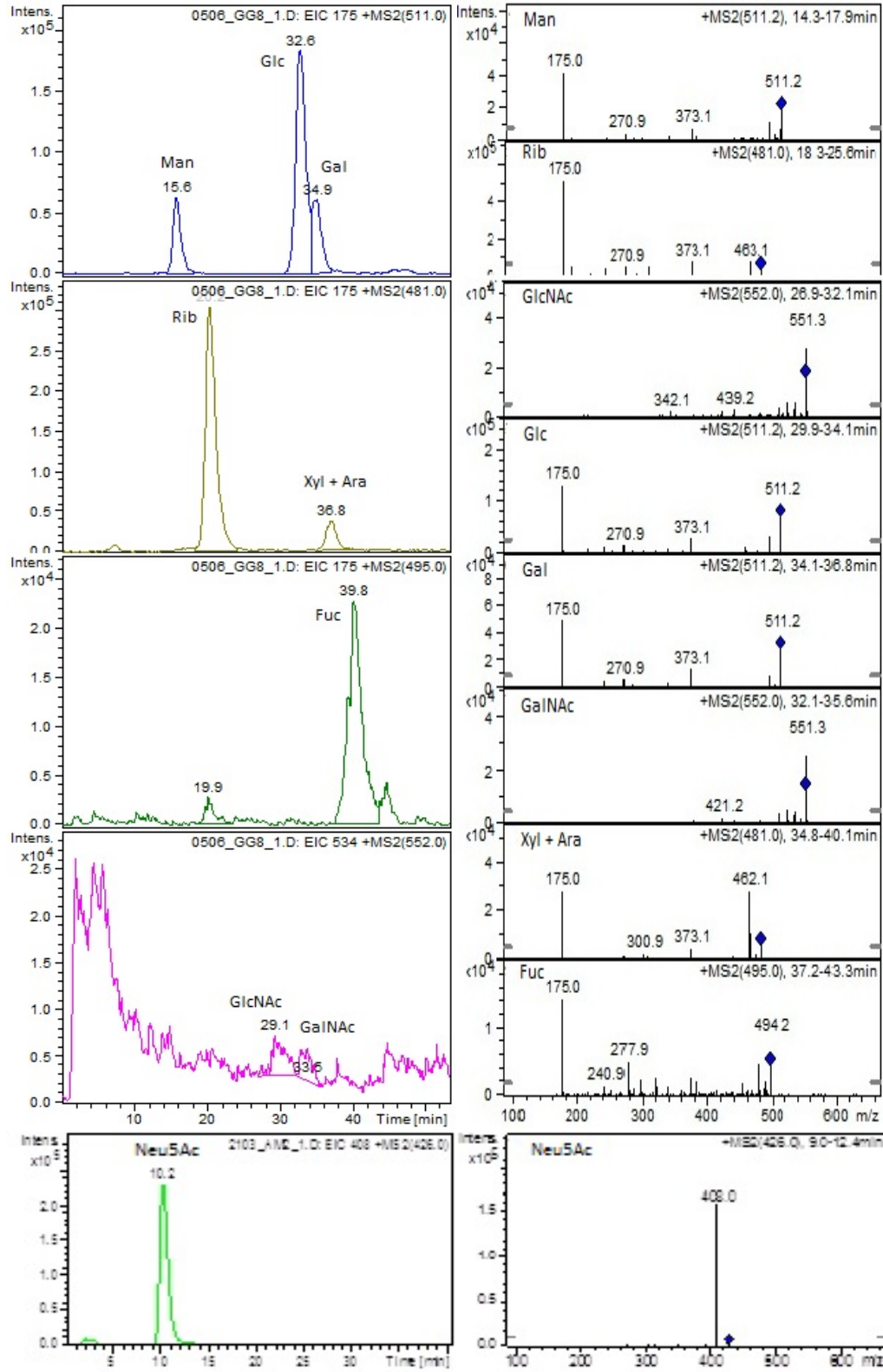
Şekil 4.3. 3. Larval Dönem Monosakkaritlerinin LC-MS Kromatogram ve Spektrumları



Şekil 4.4. 5. Larval Dönem Monosakkaritlerinin LC-MS Kromatogram ve Spektrumları



Şekil 4.5. Hareketsiz Prepupal Dönem Monosakkaritlerinin LC-MS Kromatogram ve Spektrumları

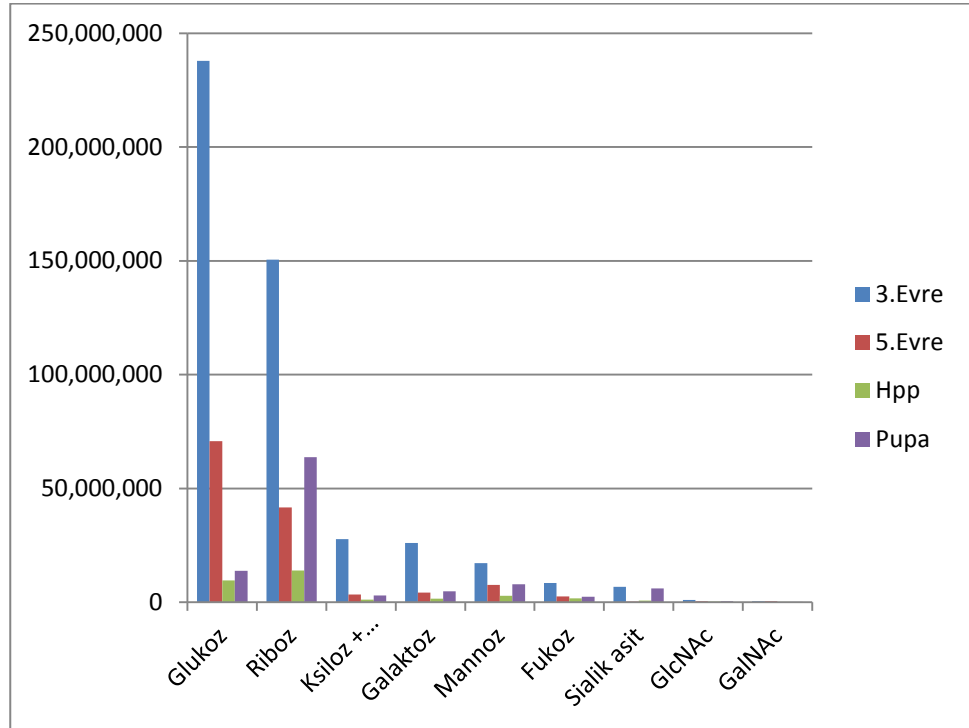


Şekil 4.6. Pupal Dönem Monosakaritlerinin LC-MS Kromatogram ve Spektrumları

Seçilen bütün monosakkaritlerin evrelere göre verdiği mutlak pik alanları ve pik alanlarına göre çizilen grafikleri izelge 4.1 ve Şekil 4.7’de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.1. Bütün Monosakkaritlerin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Glukoz	237.877.989	70.722.687	9.621.239	13.753.924
Riboz	150.436.603	41.712.528	13.947.659	63.674.847
Ksiloz +Arabinoz	27.722.661	3.454.826	1.156.503	3.035.440
Galaktoz	26.062.070	4.185.426	1.516.753	4.769.071
Mannoz	17.170.547	7.659.362	2.781.330	7.826.532
Fukoz	8.430.540	2.558.989	1.666.755	2.446.218
Sialik Asit	6.827.852	352.858	664.791	6.023.231
GlcNAc	938.935	447.248	254.682	372.003
GalNAc	383.249	439.670	192.579	182.455



Şekil 4.7. Bütün Monosakkaritlerin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiki

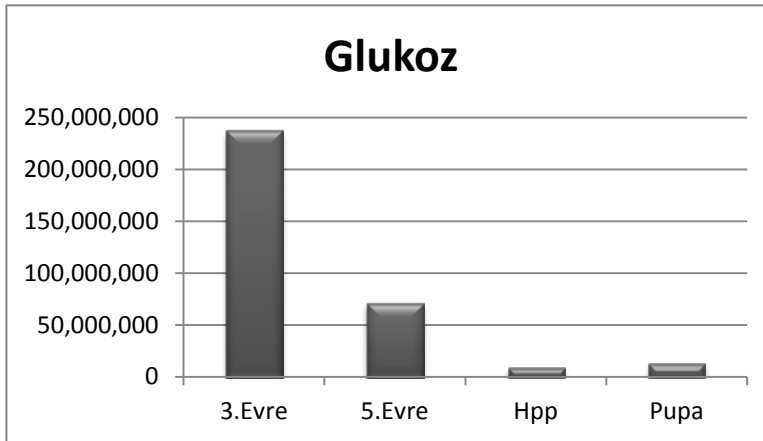
Glukoz, hücrede enerji kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra, epimerizasyonla diğer monosakkaritlere değişmekte ve ayrıca N- ve O-glikanlarla glikosfingolipitlerin yapılarına katılmaktadır. Glukozun evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.2 ve 4.3’de, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Glukozun evrelere bağlı miktar değişikliklerine bakıldığında 3.evrede en yüksek seviyede pik alanı bulunmuştur. Genç evre olarak seçilen bu dönemde yaşlı evre olarak seçilen hareketsiz prepupal evreye göre miktarı 24 kat daha fazladır. 5.evreden itibaren glukoz miktarında düşme gözlenmiştir. Bununla beraber Hpp dönemine göre 7,5 kat daha fazla miktarlardadır. Yaşlı evre olan hareketsiz prepupa evresinde azalarak glukoz en düşük seviyeye ulaşmıştır. Ergin dokuların yeniden yapılandırılması sırasında yaşlı evreye nazaran yaklaşık 1,5 kat daha fazla glukoz bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Glukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Glukoz	237.877.989	70.722.687	9.621.239	13.753.924

Çizelge 4.3. Glukozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Glukoz	24	7,5	1	1,5



Şekil 4.8. Glukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

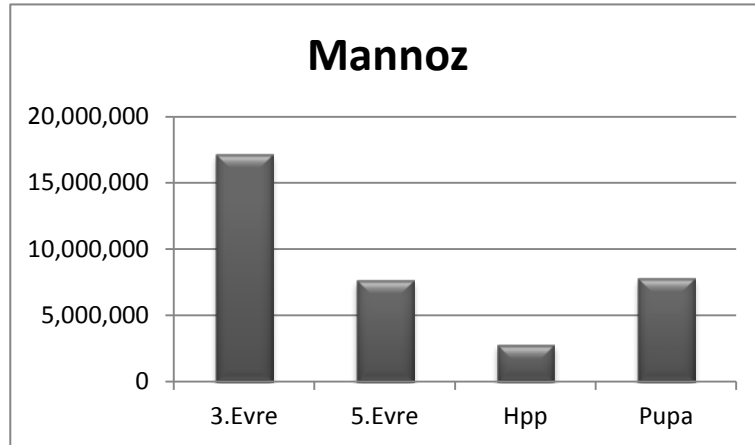
Mannoz; N-bağı glikoproteinlerde en bol bulunan yüksek mannoz tip N-glikanların temel yapıtaşlarından biridir. Mannozun evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.4 ve 4.5’de, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Mannoz, en genç olan 3.evrede yaşlı dokuların örneğine göre (Hpp’ya göre) yaklaşık 6 kat daha fazla bulunmuştur. Bu sonuç en genç dokuda yüksek mannoz tip N-glikanların çok bulunduğuna işaret eder. Yaşlanan evrelerde (5.evre ve Hpp’da) gittikçe azalır. Larval dokuların bozularak ergin dokuların yeniden yapılandığı pupa döneminde ise yeniden yüksek oranda görülmektedir.

Çizelge 4.4. Mannozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Mannoz	17.170.547	7.659.362	2.781.330	7.826.532

Çizelge 4.5. Mannozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Mannoz	6	3	1	3



Şekil 4.9. Mannozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

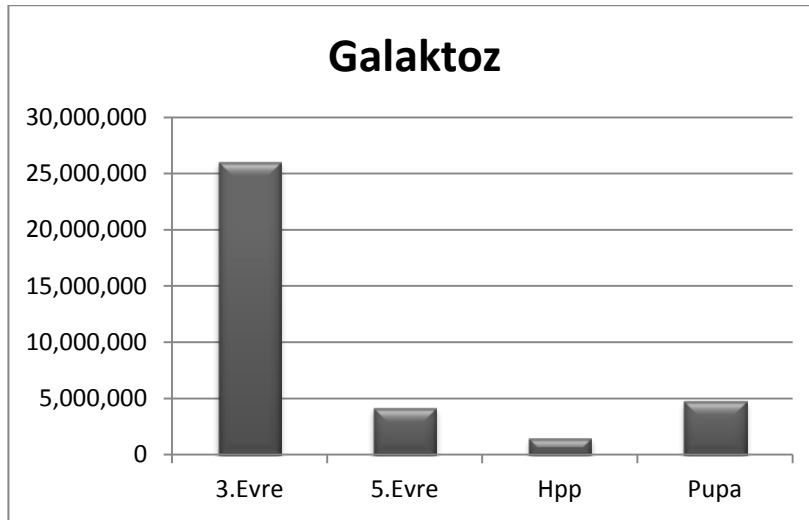
Galaktoz; N- ve O-bağlı glikanlarda ve glikolipitlerde polilaktozamin yapılarında bulunmaktadır. Galaktozun evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.6 ve 4.7’de, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.10’da gösterilmiştir. Galaktoz, en yüksek olarak 3.evre larval dönemde bulunmuştur. En genç olan 3.evrede yaşlı dokuların örneği olan hareketsiz prepupa’ya göre yaklaşık 17 kat daha fazla bulunmuştur. 5.evrede önemli ölçüde düşen galaktoz miktarı en düşük seviyesine hareketsiz prepupa döneminde ulaşmıştır. Pupal evrede ise yeniden artışa geçerek hareketsiz prepupal evreye göre 3 kat daha fazla bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Galaktozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Galaktoz	26.062.070	4.185.426	1.516.753	4.769.071

Çizelge 4.7. Galaktozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Galaktoz	17	2,75	1	3



Şekil 4.10. Galaktozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

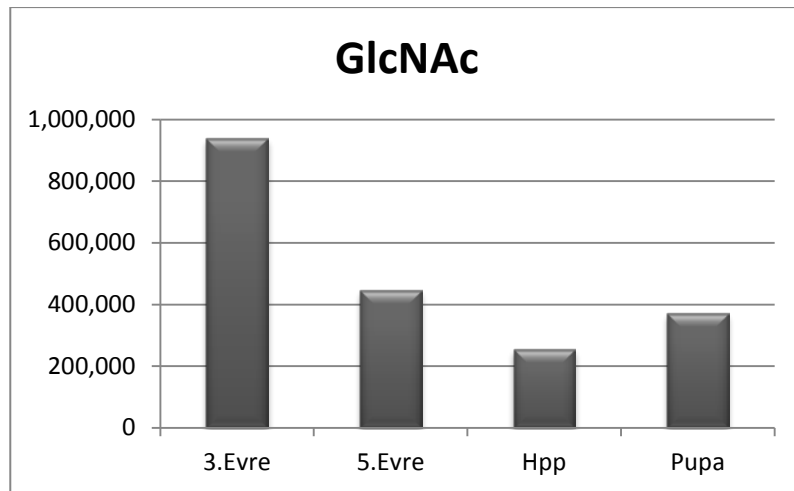
N-asetilglukozamin monosakkariti, yüksek mannoz tip N-glikanların karmaşık ve hibrit tip N-glikanlara dönüşümünde anahtar rol oynar. Heparan sülfat, Heparin, Hyaluronik asit ve Keratan sülfat tip glikozaminoglikanların tekrarlayan disakkaritlerindeki monosakkaritlerden birisidir. Ayrıca galaktozla polilaktozamin yapılarını oluşturur. N-asetilglukozaminin evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.8 ve 4.9’da, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.11’de gösterilmiştir. N-asetilglukozamin monosakkarit miktarları en yüksek olarak 3.evre larval dönemde bulunmuştur. Bu miktar yaşlı dokuların örneği hareketsiz prepupaya göre yaklaşık 3,5 kat daha fazladır. Diğer monosakkaritlerde olduğu gibi 3.evreden sonra hareketsiz prepupa dönemine kadar düşüş göstererek bu evrede en düşük seviyelerine ulaşmıştır. Pupal döneme girilmesiyle birlikte bu monosakkarit miktarlarında yeniden artış meydana gelerek 1,5 kat artmıştır.

Çizelge 4.8. N-asetilglukozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
GlcNAc	938.935	447.248	254.682	372.003

Çizelge 4.9. N-asetilglukozaminin Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
GlcNAc	3,5	2	1	1,5



Şekil 4.11. N-Asetilglukozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

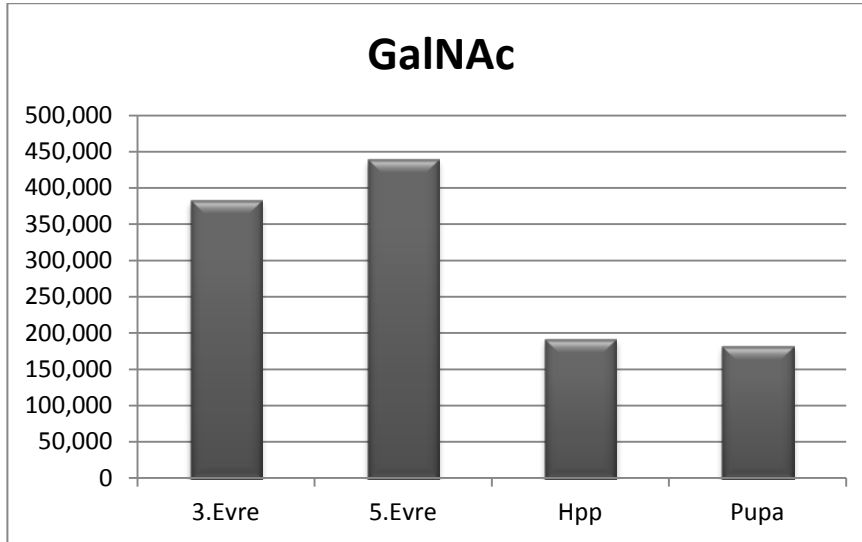
N-asetilgalaktozamin, musin tip O-glikanlarda serin veya treonine bağlanan ilk şekerdir. Kondroitin sülfat ve Dermatan sülfat tip glikozaminoglikanların tekrarlanan disakkarit yapısında bulunmaktadır. N-asetilgalaktozaminin evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.10 ve 4.11’de, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.12’de gösterilmiştir. N-asetilgalaktozamin miktarları diğer monosakkaritlerden farklı olarak 3.evre larval dönemden itibaren artışa geçerek en yüksek seviyeye 5.evre larval dönemde ulaşmıştır. Hareketsiz prepupada yarı yarıya azalan GalNAc miktarları biraz daha azalarak en düşük seviyesine pupal dönemde ulaşmıştır.

Çizelge 4.10. N-asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
GalNAc	383.249	439.670	192.579	182.455

Çizelge 4.11. N-asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
GalNAc	2,1	2,5	1,1	1



Şekil 4.12. N-asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

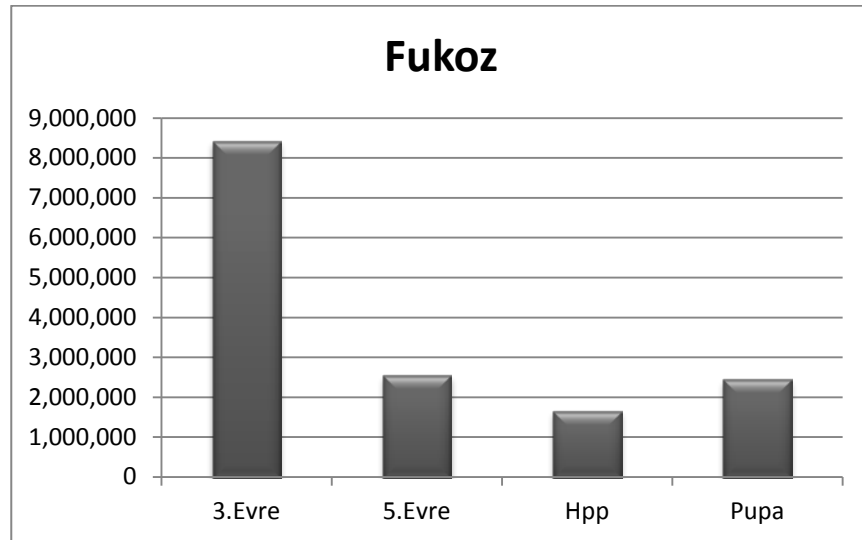
Fukoz şekerin N- ve O-bağlı glikanları çeşitlendirdiği bilinmektedir. Çeşitlenmeleri ligand ve reseptörlerin farklılaştırılması yoluyla gelişmenin ilerlemesi için anlamlıdır. Fukozun evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.12 ve 4.13’de, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.13’de gösterilmiştir. En yüksek miktarları genç evre olarak seçilen 3.evre larval dönemde, en düşük seviyelerinin tespit edildiği yaşlı evre hareketsiz prepupal döneme göre 5 kat daha fazla bulunmuştur. Pupal dönemde yeniden artışa geçerek 5.evre larval dönemdeki miktarlarına benzer şekilde, hareketsiz prepupal evreye göre ise 1,5 kat daha fazla bulunmuştur.

Çizelge 4.12. Fukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Fukoz	8.430.540	2.558.989	1.666.755	2.446.218

Çizelge 4.13. Fukozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Fukoz	5	1,5	1	1,5



Şekil 4.13. Fukozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

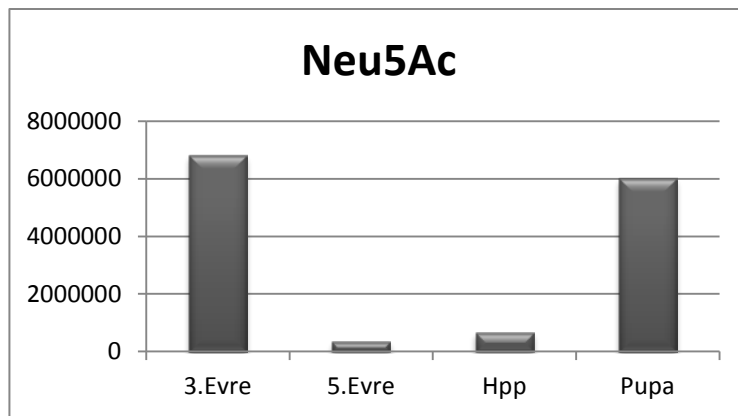
Sialik asitler yüksek organizasyonlu hayvanlarda ve bazı mikroorganizmalarda bulunan elektronegatif olarak yüklü monosakkaritlerdir. Doğada 65 tipi olduğu bildirilen sialik asitlerin çalışılan evrelerde **temel sialik asit tipi olan Neu5Ac** için standartla aynı alıkonma zamanında aynı iyonlar bulunmuştur. Sialik asitin evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.14 ve 4.15’de, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.14’de gösterilmiştir. Karşılaştırılan dokularda belirlenen Neu5Ac miktarları en yüksek 3.evre larval dönemde tespit edilmiştir. Genç evre olarak seçilen 3.evre larvaya göre, larval gelişimin son evresi olan 5.evre larval dönem ve yaşlanmış evre olarak seçilen hareketsiz prepupa evrelerinde sırasıyla 20 kat ve 10 kat daha az miktarda Neu5Ac bulunmuştur. Dokuların yeniden yapılandığı evre olan pupal evrede Neu5Ac miktarı 3.evre larval dönemde olduğu gibi yeniden yüksek seviyelere ulaşmıştır.

Çizelge 4.14. Sialik Asit’in Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Sialik Asit	6.827.852	352.858	664.791	6.023.231

Çizelge 4.15. Sialik Asitin Evrelere Göre Oransal Olarak Değişiminin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Sialik Asit	10	0,5	1	9



Şekil 4.14. Sialik Asit Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

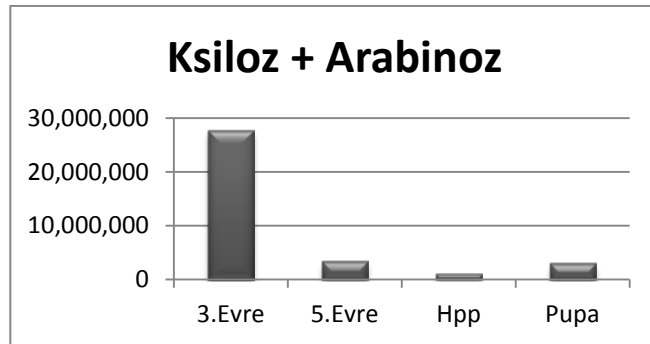
Ksiloz, böceklerdeki en bol bulunan glikozaminoglikanlar olan heparan sülfat ve kondroitin sülfat oluşumunda serin veya treonin aminoasitlerine bağlanan ilk monosakkarittir. **Arabinoz** ise böcek dokularında iz miktarlarda bulunmaktadır. Ksiloz ve arabinoz monosakkaritleri yapısal olarak çok benzedikleri için MS sisteminde ayırmak mümkün olmadığından analizleri birlikte tanımlanmıştır. Ksiloz ve arabinozun evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.16 ve 4.17’de, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.15’de gösterilmiştir. **Ksiloz ve arabinoz** miktarı en yüksek olarak 3.evre larvada bulunmuştur. Ksiloz ve arabinoz miktarı, 5.evrede 3.evreye göre 8 kat düşük tespit edilmiştir. Yaşlı evre olarak seçilen hareketsiz prepupa döneminde 3.evreye göre 24 kat, 5.evreye göre 3 kat daha düşük ksiloz ve arabinoz miktarları tespit edilmiştir. Pupal dönemde ise ksiloz ve arabinoz miktarlarında hareketsiz prepupaya göre 2,6 kat artış belirlenmiştir. 3.evrede yüksek miktarlardaki ksiloz varlığı glikozaminoglikanların bu evrede bol bulunduğunu işaret etmektedir. 5.evre ve pupal dönemde de yaşlı evre olan hareketsiz prepupaya göre daha fazla glikozaminoglikan bulunmaktadır.

Çizelge 4.16. Ksiloz ve Arabinozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Ksiloz+Arabinoz	27.722.661	3.454.826	1.156.503	3.035.440

Çizelge 4.17. Ksiloz ve Arabinozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişimlerinin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Ksiloz+Arabinoz	24	3	1	2,6



Şekil 4.15. Ksiloz ve Arabinozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

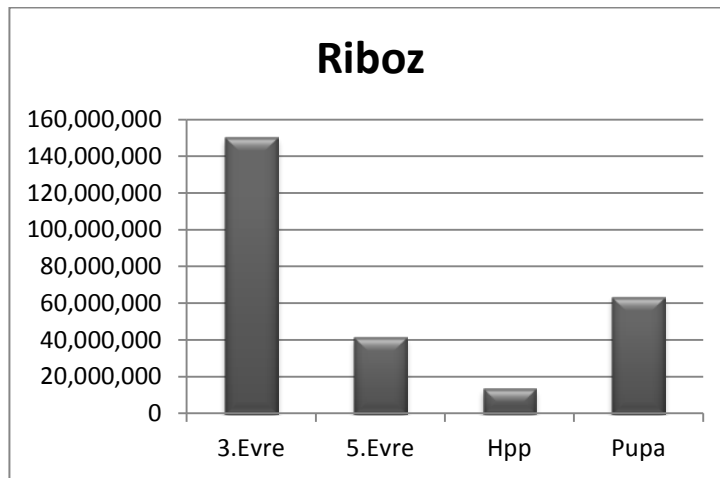
Proteinlerin sentezi üç tip RNA'nın (mRNA, tRNA ve rRNA) birlikte çalışmasıyla gerçekleşir. Kimyasal yapılarında riboz şeker nükleotidlerin merkezinde yer alır. Karşılaştırılan evrelerde riboz farklılıkları, protein sentezi derecesini işaret etmektedir. Bu monosakkaritin değişiklikleri yaşlanmaya bağlı protein sentezinin seviyesi hakkında bilgi vermektedir. Ribozun evrelere göre mutlak pik alanları ve oranları Çizelge 4.18 ve 4.19'da, mutlak pik alan grafiği Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Yaşlı evre olarak seçilen hareketsiz prepupal dönemde genç evre olarak seçilen 3.evre larval döneme göre yaklaşık 10 kat daha az riboz monosakkariti bulunmuştur. Bu da yaşlı dönemde genç döneme göre daha az protein sentezi olduğunu işaret etmektedir. Yeniden yapılanmanın tekrar başladığı pupal evrede riboz miktarları artarak yaşlı evreye oranla 5 kat daha fazla bulunmuştur. Bu da protein sentezinin yeniden arttığını işaret etmektedir.

Çizelge 4.18. Ribozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Riboz	150.436.603	41.712.528	13.947.659	63.674.847

Çizelge 4.19. Ribozun Evrelere Göre Oransal Olarak Değişimlerinin Gösterilmesi

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Riboz	10,8	3	1	4,5



Şekil 4.16. Ribozun Evrelere Göre Mutlak Pik Alanı Grafiği

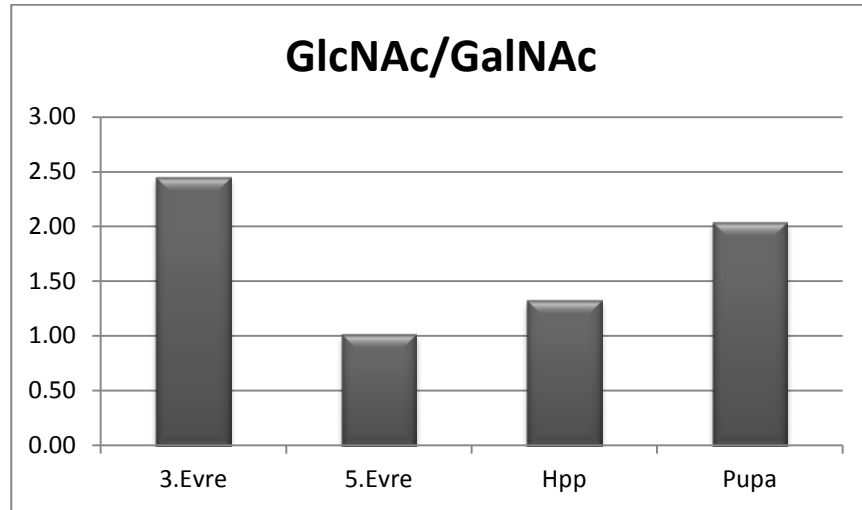
4.1.3. N-Bağlı ve O-Bağlı Glikoproteinlerle Proteoglikanların Evrelere Göre Değişimi

Glikoprotein ve proteoglikanlardaki değişimler, bu grup biyomoleküller için karakteristik monosakkaritlerin değişimleri ve oranlarının karşılaştırılmasıyla gösterilmiştir. Örneğin; N-asetilglukozamin monosakkariti N-bağlı glikanların, N-asetilgalaktozamin monosakkariti O-bağlı glikanların, ksiloz monosakkariti proteoglikanların, glukoz ve galaktoz monosakkaritleri de glikolipitlerin başlangıç şekerleridir.

N-bağlı ve O-bağlı glikoproteinlerin değişimlerini görebilmek için; böcek N-glikanlarında bol bulunan **N-asetilglukozamin** monosakkariti ile, O-glikanların çekirdeklerinin temel elemanlarından olan **N-asetilgalaktozamin** monosakkariti oranları Çizelge 4.20 ve Şekil 4.17’de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.20. GlcNAc ve GalNAc’ın Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oranı

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
GlcNAc/GalNAc	2,45	1	1,32	2



Şekil 4.17. GlcNAc ve GalNAc’ın Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği

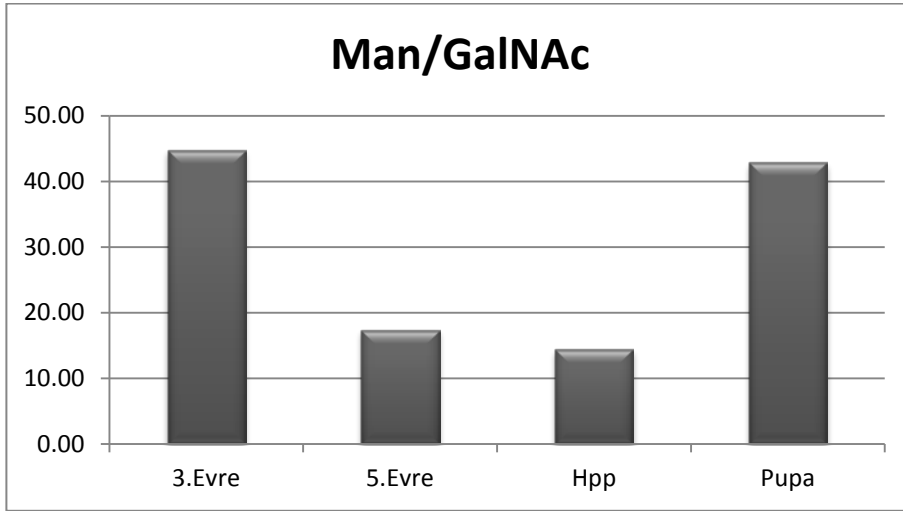
N-bağlı glikoproteinler 3.evre larvada 5.evreye göre yaklaşık 2,5 kat daha fazla bulunmuştur. 5.evre larval dönemde N-bağlı glikanlar ile O-bağlı glikanların oranı yaklaşık olarak aynıdır. 5.evre larval dönemden pupal döneme gidildikçe N-

bağlı proteinlerin O-bağlı proteinlere göre yeniden daha baskın hale geldiği görülür. Ergin dokuların yeniden yapılandığı pupal dönemde N-bağlı glikanların O-bağlı glikanlara oranla 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

N-bağlı ve O-bağlı glikoproteinlerin değişimlerini görebilmek için N-glikanlarının büyük bir kısmını oluşturan yüksek mannoz tip N-glikanların temel monosakkariti olan **mannoz** ile, O-glikanların çekirdeklerinin temel elemanlarından olan **N-asetilgalaktozamin** monosakkarit oranları da Çizelge 4.21 ve Şekil 4.18’de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.21. Mannoz ve N-asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oranı

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Man/GalNAc	44,80	17,42	14,44	42,90



Şekil 4.18. Mannoz ve N-asetilgalaktozaminin Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği

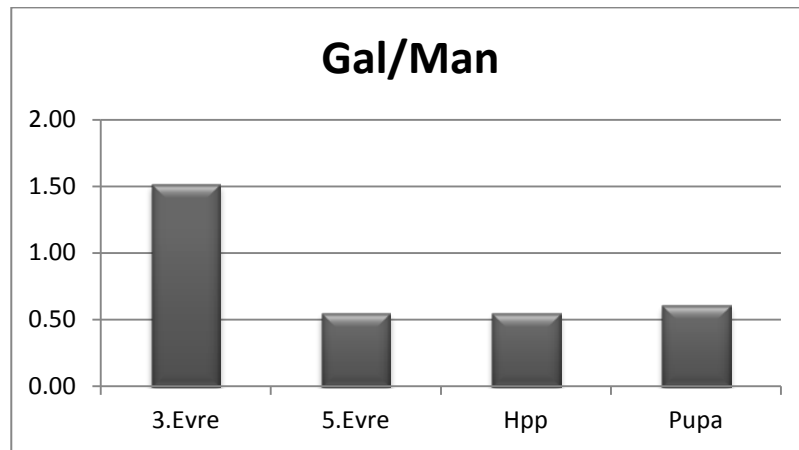
Mannozun N-asetilgalaktozamine oranlanması ile, 3.evre larvada N-bağlı glikoproteinler O-bağlı glikoproteinlere oranla 44 kat daha fazla bulunmuştur. 5.evre larvada bu oran azalarak yaklaşık 17 kata düşmüştür. Hpp evresinde ise hala N-glikanlar O-glikanlardan daha fazla bulunarak en düşük oran tespit edilmiştir. Ergin dokuların yeniden yapılandığı pupal dönemde ise N-

glikanların O-glikanlara oranı genç evre olarak seçilen 3.evreye benzeyerek yaklaşık 43 kat daha fazla olarak bulunmuştur.

N-glikanlar proteinler üzerinde 3 farklı tipte şekillenmektedir. Bunlar yüksek mannoz tip, hibrit tip ve karmaşık tip N-glikanlardır. Bu değişik tiplerin oluşmasında N-asetilglukozamin monosakkariti hem dallanmaların meydana gelmesi hem de dalların uzaması ve polilaktozaminlerin şekillenmesi için gereklidir. Bu glikan tiplerindeki değişiklikleri belirlemek için 3 farklı parametre kullanılmıştır. **Mannozun N-asetilglukozamine** oranlanması ile yüksek mannoz tip N-glikanlardaki, **galaktozun mannoza** oranlanması ile hibrit tip N-glikanlardaki, **galaktozun fukoza** oranlanmasıyla ise karmaşık tip N-glikanlardaki yaşlanmaya bağlı değişiklikler belirlenmiştir. Galaktoz/Mannozun ve Mannoz/N-asetilglukozaminin evrelere göre mutlak pik alan oranları sırasıyla Çizelge 4.22-23’de ve Şekil 4.19-20’de gösterilmiştir. Ayrıca karmaşık tip N-glikanların polilaktozamin zincirlerinin elemanlarından olan **galaktozun**, yüksek mannoz tip ve az sayıda mannozlu (pausimannozidik) tip N-glikanların elemanlarından olan **fukoza** oranı da N-glikan tip değişimlerini işaret etmektedir.

Çizelge 4.22. Galaktoz ve Mannoz’un Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oranı

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Galaktoz/Mannoz	1,52	0,55	0,55	0,61

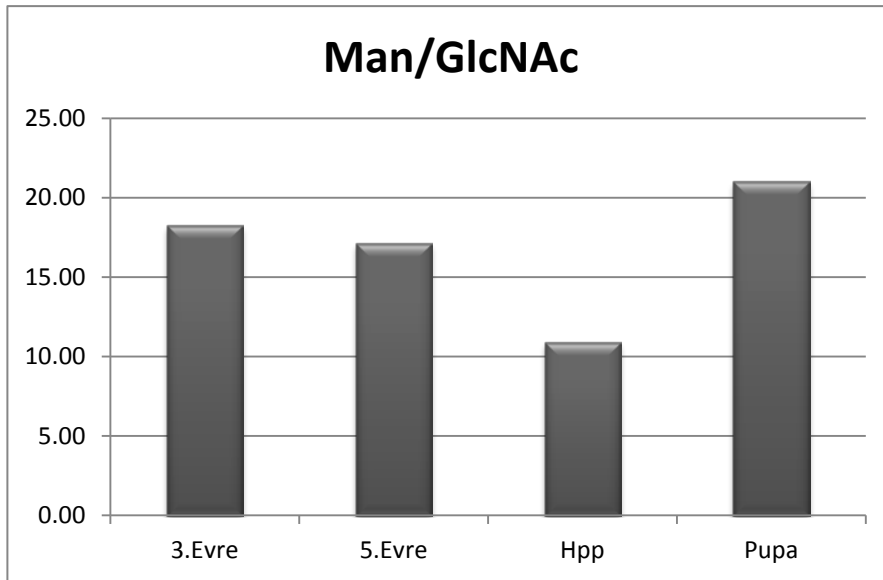


Şekil 4.19. Galaktoz ve Mannoz’un Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği

Genç evre olarak seçilen 3.evre larval dönemde **Galaktoz/Mannoz** oranı en yüksek olarak (yaklaşık 1,5 kat) bulunmuştur. Galaktoz/Mannoz oranları 3.evre larval dönemden hareketsiz prepupal döneme doğru hem galaktozun hem de mannozun mutlak pik alanı değerlerinde düşme nedeniyle azalmıştır. Hareketsiz prepupal dönemden pupal döneme doğru gidildikçe bu oran hem galaktoz hem de mannoz şekerlerindeki benzer artışlar nedeniyle önemli ölçüde değişmeden kalmıştır.

Çizelge 4.23. Mannoz ve N-asetilglukozamin'in Evrelere Göre Mutlak Pik Alan Oranları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Man/GlcNAc	18,29	17,13	10,92	21,04



Şekil 4.20. Mannoz ve N-asetilglukozamin'in Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği

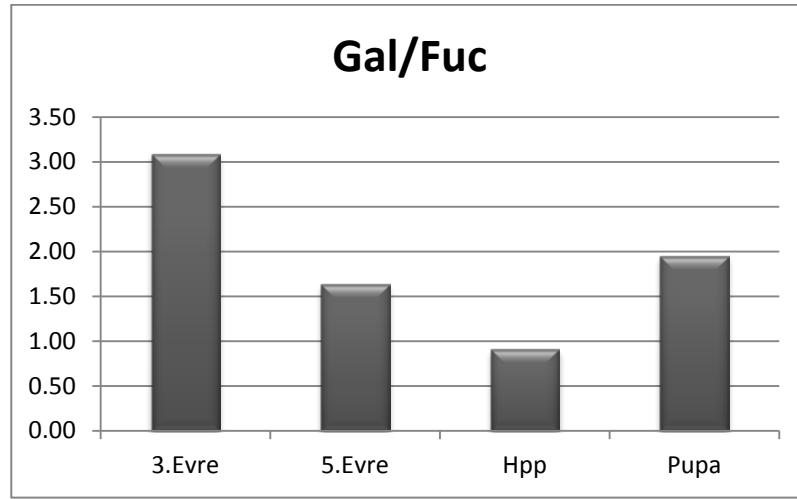
Yüksek mannoz ve hibrit tip N-glikanların monosakkaritleri olan **mannozun N-asetilglukozamine** oranı 3. evre larval dönemde yüksek derecede bulunmuştur. Mannoz/N-asetilglukozamin oranları 3.evre larval dönemden hareketsiz prepupal döneme doğru azalış göstermiştir, fakat hareketsiz prepupal dönemden pupal döneme doğru gidildikçe bu oran en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

Fukoz böceklerde bol bulunan yüksek mannoz tip ve az sayıda mannozlu (pausimannozidik) tip N-glikanlarda α 1,3 ve/veya α 1,6 bağlı şekilde

bulunmaktadır. Ayrıca O-fukoz glikanlarını da oluşturmaktadır. **Galaktoz** ise N-glikan, O-glikan ve glikolipitlerin uzayan polilaktozamin zincirlerinde tekrarlayan birim olarak bulunmaktadır. **Bu iki monosakkaritin karşılaştırılmasıyla** da karmaşık ve yüksek mannoz tip N-glikan değişimleri hakkında bilgi elde edilir. Çizelge 4.24 ve Şekil 4.21’de galaktoz ve fukozun evrelere göre mutlak pik alanları oranlanmıştır.

Çizelge 4.24. Galaktoz ve Fukoz’un Evrelere Göre Mutlak Pik Alan Oranları

	3.Evre	5.Evre	Hpp	Pupa
Gal/Fuc	3,06	1,64	0,91	1,95



Şekil 4.21. Galaktoz ve Fukoz’un Evrelere Göre Mutlak Pik Alanları Oran Grafiği

Galaktozun fukoza oranı en yüksek olarak genç evreyi temsil eden 3.evre larvada 3,06 olarak bulunmuştur. Bu oran polilaktozamin zincirlerini içeren karmaşık tip N-glikanların bu evrede daha bol bulunduğunu göstermektedir. Yaşlanmakta olan ve yaşlı organizmaların örnekleri olan sırasıyla 5.evre larva ile hareketsiz prepupa evrelerine doğru gidildikçe oran azalır. Yaşlı organizmada değer yaklaşık olarak eşittir. Pupal evrede galaktoz fukoza göre iki kat daha artar. Tekrar yapılanmanın gerçekleştiği de karmaşık tip N-glikanların yeniden oluşmaya başladığını işaret etmektedir.

Sonuç olarak; hibrit ve karmaşık tip N-glikanlar, polilaktozamin zincirleri ve proteoglikanlar en bol 3.evre larvada bulunurlar (Çizelge 4.25). Yüksek

mannoz tip N-glikanlar olgun larva örneği 5.evre larvada hala yüksek miktarda bulunurken, diğer tip N-glikanlar ve proteoglikanlar önemli ölçüde düşer. Yaşlı organizma örneği olan hareketsiz prepupada tüm glikan tipleri ve proteoglikanlar genel olarak en düşük düzeydedir. Yeniden yapılanma sürecinde N-glikan tiplerinin yeniden arttığı ve yüksek mannoz tip N-glikanların en yüksek düzeylerine ulaştığı görülür.

Çizelge 4.25. N-ve O-Bağlı Glikanlar, Polilaktozamin Zincirleri ve Proteoglikanlarla Genel Glikoprotein İçeriğinin Evrelere Göre Dağılışı

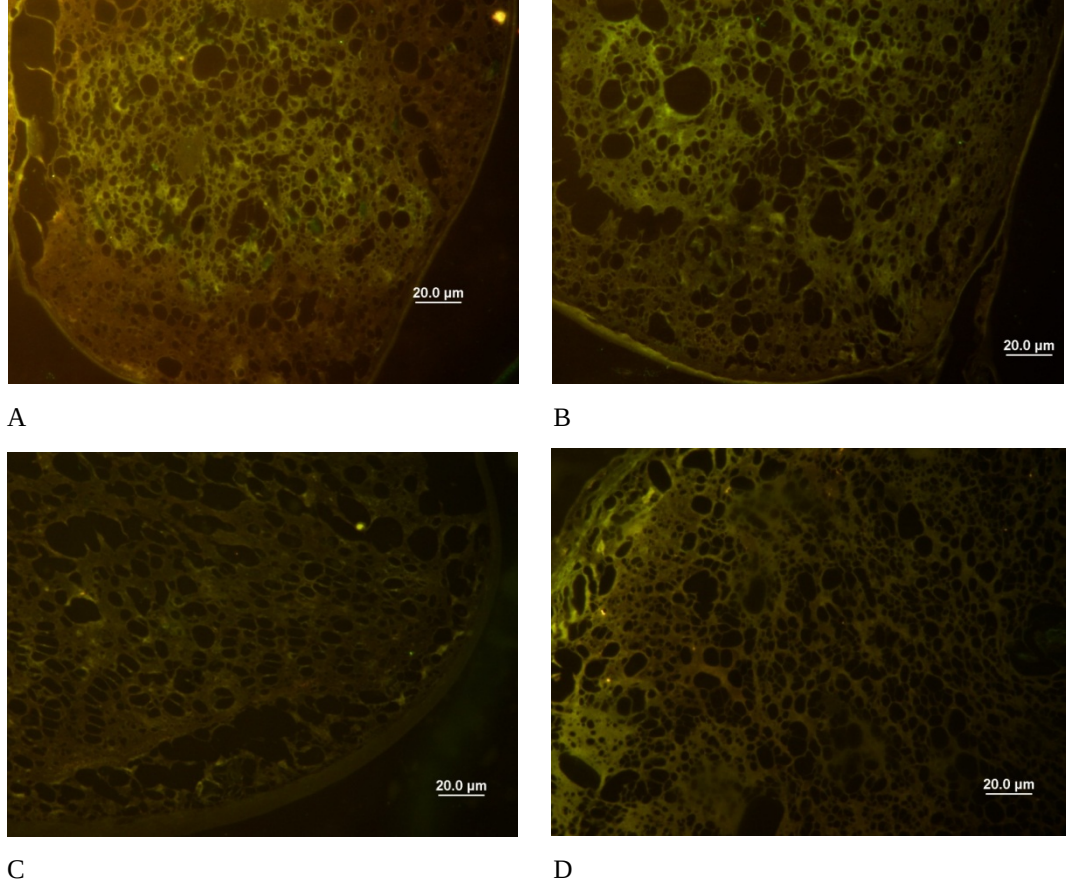
	N- ve O-bağlı Glikanlar, GAG'lar (GlcNAc/GalNAc)	N- ve O-bağlı Glikanlar (Man/GalNAc)	Yüksek Manno- z tip N-glikan (Man/GlcNAc)	Hibrit tip N- glikan (Gal/Man)	Karmaşık tip N- glikan ve Polilaktozamin (Gal/Fuc)	Ksiloz (GAG)	Glikoprotein İçeriği (SDS-PAGE)
3.Evre	En Yüksek	En Yüksek	Yüksek	En Yüksek	En Yüksek	En Yüksek	Çok Düşük
5.Evre	En Düşük	Düşük	Yüksek	En Düşük	Düşük	Düşük	Çok Düşük
Hpp	Düşük	En Düşük	En Düşük	En Düşük	En Düşük	En Düşük	En Yüksek
Pupa	Yüksek	Yüksek	En Yüksek	Düşük	Yüksek	Düşük	Çok Düşük

4.2. FITC-İşaretli Lektin Uygulamaları

4.2.1. FITC-İşaretli Lektinlerle Sialik Asit Glikozidik Bağlanmalarının Belirlenmesi

FITC-işaretli lektinlerle glikokonjugatlarda bulunan sialik asit glikozidik bağ tipleri floresan mikroskopla belirlenmiştir. Bütün sialik asit tiplerinin belirlenmesi için FITC-işaretli LFA (*Limax flavus* aglutinin) lektini, α 2,3 bağlı sialik asitlerin belirlenmesi için MAA (*Maackia amurensis* aglutinin, Neu5Ac α 2,3Gal zincirini tanır) lektini, glikoproteinlerde α 2,6 bağlı sialik asitlerin belirlenmesi için SNA (*Sambucus nigra* aglutinin, Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc zincirini tanır) lektini, karmaşık tip N-glikanlarda bulunan Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc zincirinin belirlenmesi için PSL (*Polyporus squamosus* lectin) lektini kullanılmıştır.

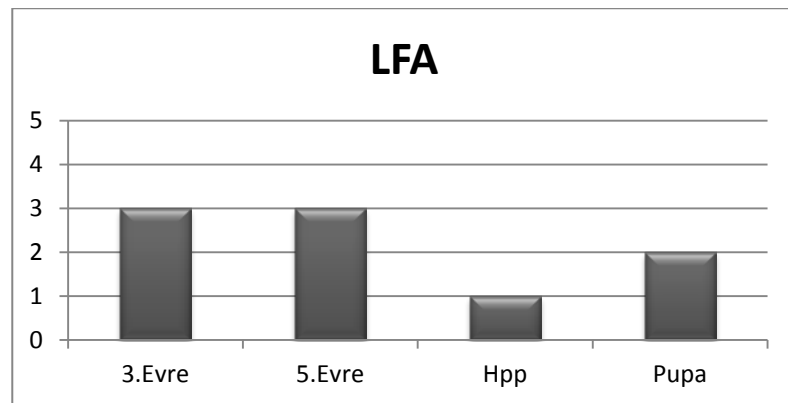
Tüm sialik asitleri tanıyıp bağlanan LFA lektinin evrelere göre ışıma görüntüleri Şekil 4.22’de, evrelere göre ışıma derecesi Çizelge 4.26’de, ışıma derecesi grafiği ise Şekil 4.23’de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. FITC-İşaretli LFA Lektini Uygulaması. (A) 3.Evre, (B) 5.Evre, (C) Hpp, (D) Pupa

Çizelge 4.26. LFA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derecesi

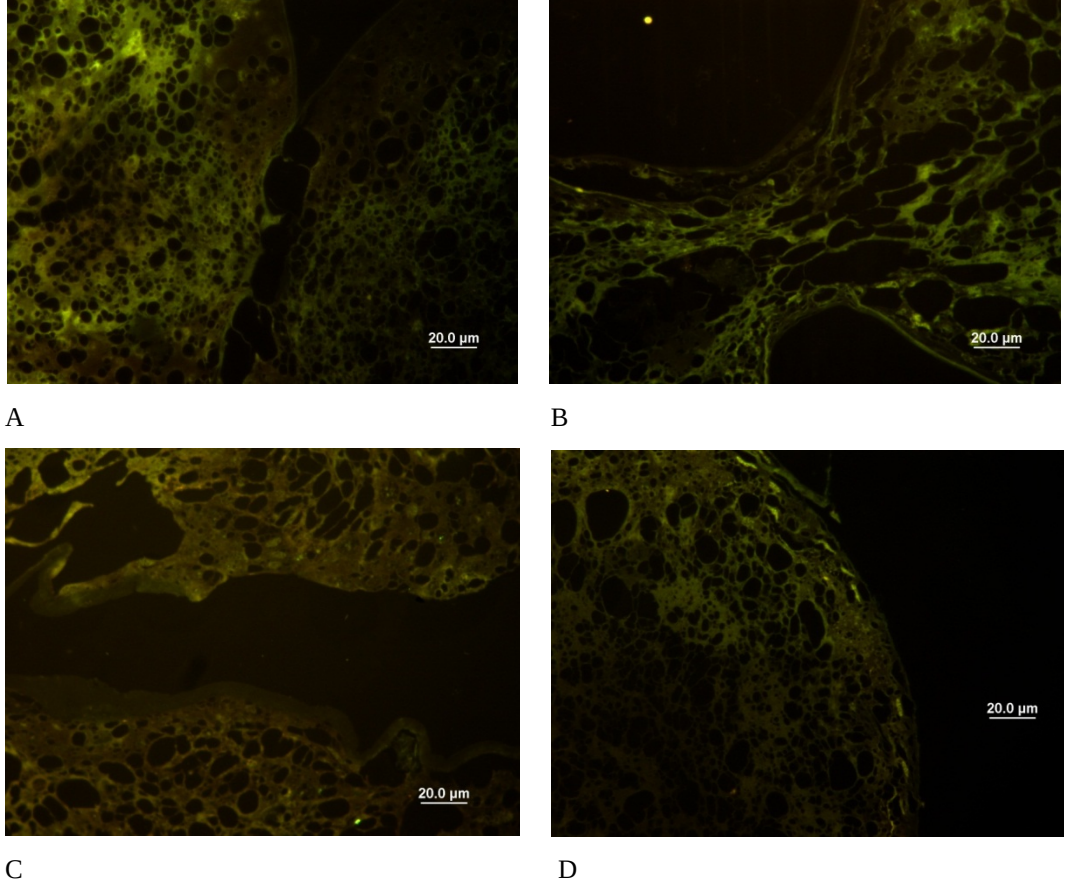
<u>LFA</u> (Tüm Siaları tanır)	
<u>Evreler</u>	<u>Işıma Derecesi</u>
3.Evre	+++
5.Evre	+++
Hpp	+
Pupa	++



Şekil 4.23. LFA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derece Grafiği

FITC-işaretli **LFA** lektininin bağlanma sonuçlarına göre en yüksek lektin işaretlenmesi 3.evre larval dönemde elde edilmiştir. Larval gelişimin son evresi olan 5.evre örneklerde fluoresan ışımlar genel olarak 3.evreye benzemektedir. Yaşlanmayı temsil eden hareketsiz prepupa evresinde bariz fluoresan ışıma azalmaları meydana gelmiştir. Ergin dokuların yeniden yapılandırıldığı evre olan pupa evresinde hareketsiz pupa evresine göre önemli ölçüde ışıma artışları gözlenmiştir.

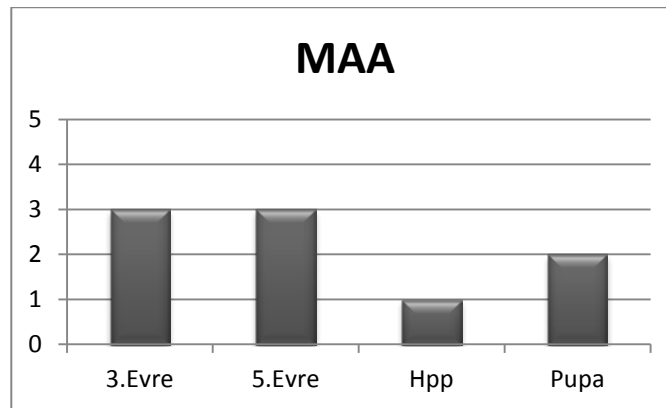
α 2,3 bağlı sialik asitleri tanıyıp bağlanan **MAA** lektinin evrelere göre ışıma görüntüleri şekil 4.24’de, evrelere göre ışıma derecesi izelge 4.27’de, ışıma derecesi grafiği ise şekil 4.25’de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. FITC-İşaretli MAA Lektini Uygulaması. (A) 3.Evre, (B) 5.Evre, (C) Hpp, (D) Pupa

Çizelge 4.27. MAA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derecesi

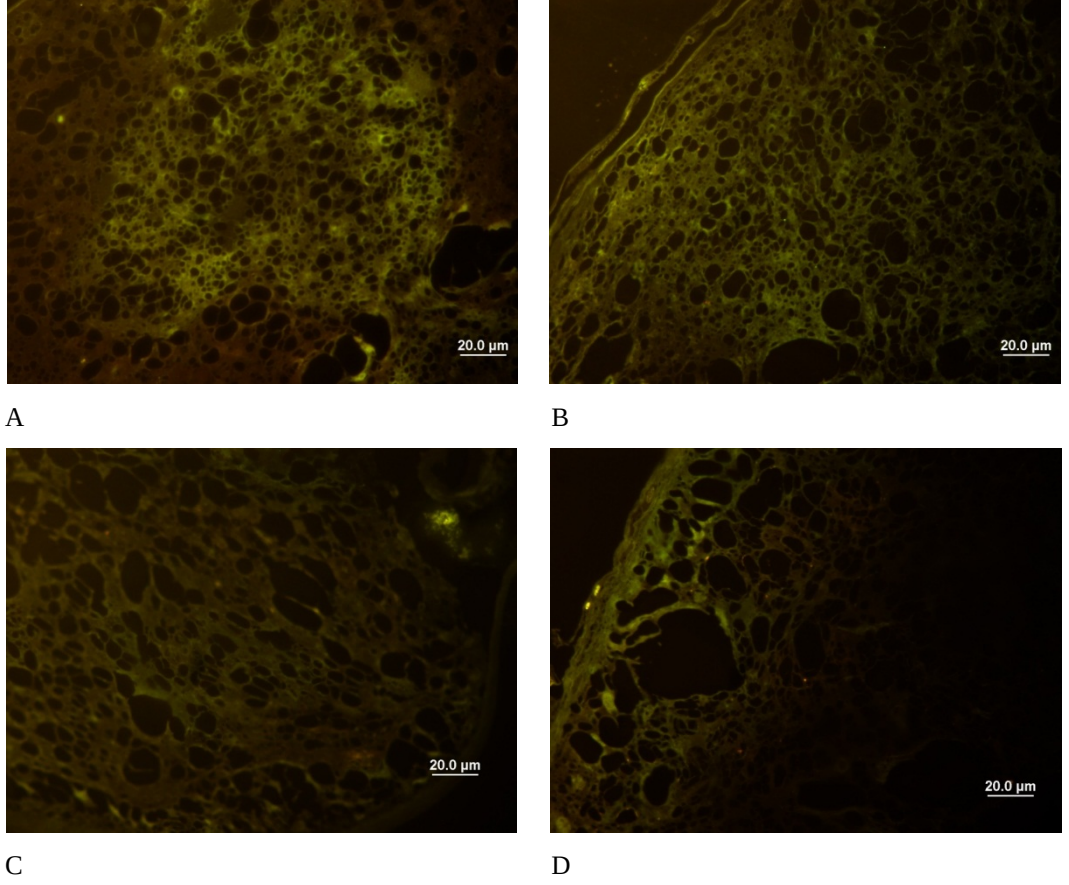
<u>MAA</u> (Neu5Ac α 2,3Gal tanır)	
<u>Evreler</u>	<u>Işıma Derecesi</u>
3.Evre	+++
5.Evre	+++
Hpp	+
Pupa	++



Şekil 4.25. MAA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derece Grafiği

FITC-işaretli **MAA** lektininin bağlanma sonuçlarına göre en yüksek lektin işaretlenmesi 3.evre ve 5.evre larval dönemde elde edilmiştir. Yaşlanmayı temsil eden hareketsiz prepupa evresinde ışımalarda azalmalar tespit edilmiştir. Pupa evresinde hareketsiz pupa evresine göre önemli ölçüde ışıma artışları gözlenmiştir.

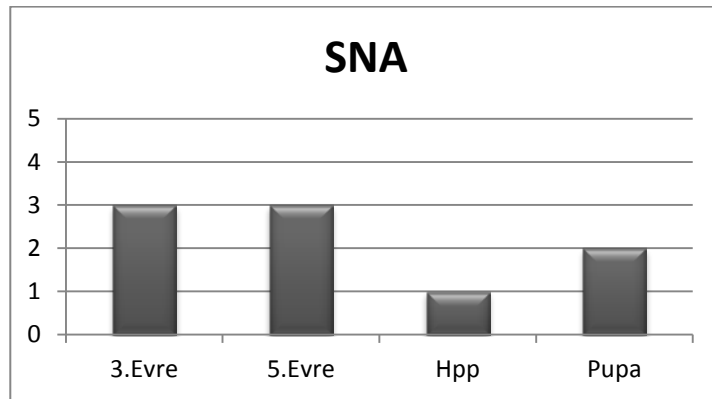
α 2,6 bağlı sialik asitleri tanıyıp bağlanan **SNA** lektinin evrelere göre ışıma görüntüleri şekil 4.26'da, evrelere göre ışıma derecesi izelge 4.28'de, ışıma derecesi grafiği ise şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.26. FITC-İşaretli SNA Lektini Uygulaması. (A) 3.Evre, (B) 5.Evre, (C) Hpp, (D) Pupa

Çizelge 4.28. SNA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derecesi

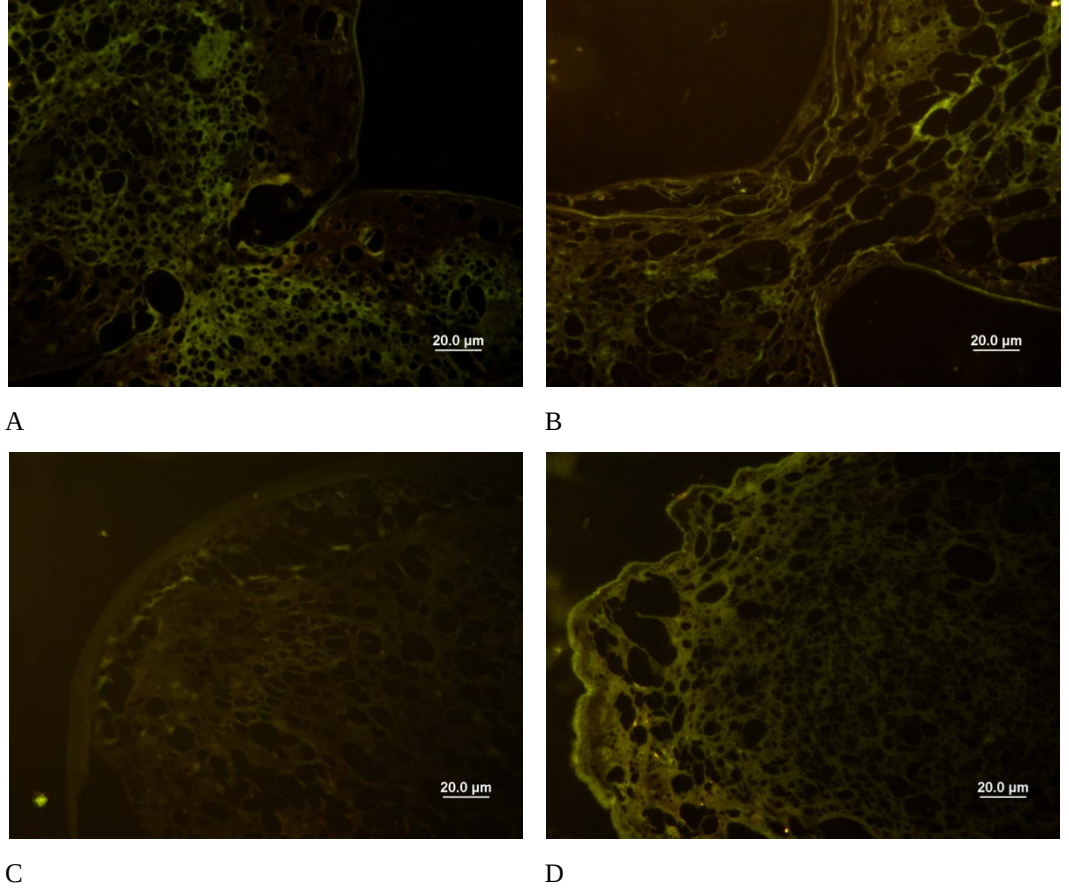
<u>SNA</u> (Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc tanır)	
<u>Evreler</u>	<u>Işıma Derecesi</u>
3.Evre	+++
5.Evre	+++
Hpp	+
Pupa	++



Şekil 4.27. SNA Lektininin Evrelere Göre Işıma Derece Grafiği

FITC-işaretli **SNA** lektininin bağlanma sonuçlarına göre en yüksek lektin işaretlenmesi 3. ve 5. larval dönemde elde edilmiştir. Hareketsiz prepupa evresinde bariz fluoresan ışıma azalmaları meydana gelmiştir. Benzer şekilde pupa evresinde hareketsiz pupa evresine göre önemli ölçüde ışıma artışları gözlenmiştir.

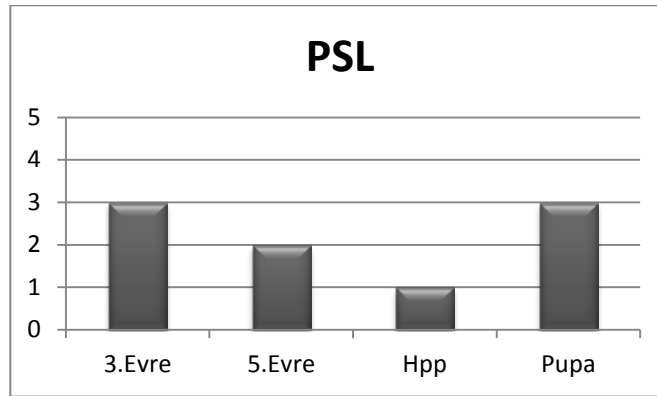
Karmaşık tip N-glikan zincirlerinin ucunda bulunan Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc zincirini tanıyıp bağlanan **PSL** lektinin evrelere göre ışıma görüntüleri şekil 4.28’de, evrelere göre ışıma derecesi izelge 4.29’da, ışıma derecesi grafiği ise şekil 4.29’da gösterilmiştir.



Şekil 4.28. FITC-İşaretili PSL Lektini Uygulaması. (A) 3.Evre, (B) 5.Evre, (C) Hpp, (D) Pupa

Çizelge 4.29. PSL Lektininin Evrelere Göre Işıma Derecesi

<u>PSL</u> (Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcNAc tanır)	
<u>Evreler</u>	<u>Işıma Derecesi</u>
3.Evre	+++
5.Evre	++
Hpp	+
Pupa	+++



Şekil 4.29. PSL Lektininin Evrelere Göre Işıma Derece Grafiği

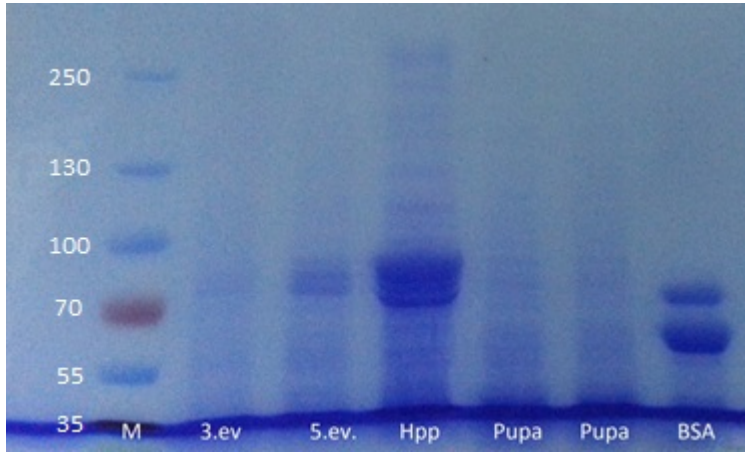
FITC-işaretli **PSL** lektinlerin bağlanma sonuçlarına göre en yüksek lektin işaretlenmesi 3.evre larval dönemde elde edilmiştir. 5.evre örneklerden itibaren yaşlanmayı temsil eden hareketsiz prepupa evresine kadar bariz fluoresan ışıma azalmaları meydana gelmiştir. Pupa evresinde hareketsiz pupa evresine göre önemli ölçüde ışıma artışları gözlenmiş ve 5.evre larval dönemde gözlenen ışımalara yakın ışımlar tespit edilmiştir.

4.3. SDS-PAGE Yöntemi İle Total Protein ve Glikoprotein Yoğunluklarının Belirlenmesi

20 µg konsantrasyonda SDS-PAGE jeline yüklenen her evreye ait proteinler, total proteinlerin belirlenmesi için Coomassie Mavisi ile, total glikoproteinlerin belirlenmesi için Periyodik Asit-Schiff boyası ile boyanmıştır.

4.3.1. Coomassie Mavisi İle Total Proteinlerin Gösterilmesi

20'şer µg konsantrasyonda jele yüklenmiş her evreye ait örneklerin Coomassie mavisi ile total protein bantlanmaları Şekil 4.30'daki gibidir.

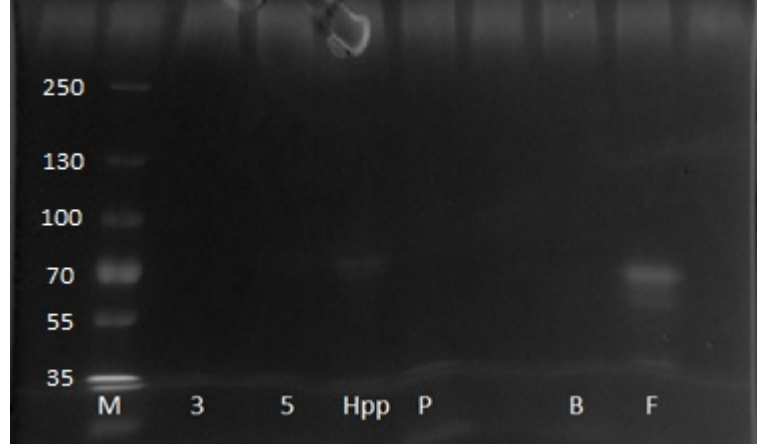


Şekil 4.30. Total Proteinlerin SDS-PAGE Jelde Coomassie Mavisi Boyaması. M; Marker, 3.ev; 3.Evre, 5.ev; 5.Evre, Hpp; Hareketsiz Prepupa, Pupa; BSA; Bovine serum albumin

Eşit konsantrasyonda protein yüklenen kuyucuklarda en yoğun protein bantlanması hareketsiz prepupal evre örneklerinde elde edilmiştir. 3.evre larval dönemden hareketsiz prepupal döneme doğru gidildikçe protein bantlanmalarında artış belirlenmiştir. En yoğun protein bantlanması 70-100 kDa boyut aralığındaki proteinlerde gözükmemektedir.

4.3.2. Periyodik Asit-Schiff Boyama İle Total Glikoproteinlerin Gösterilmesi

20'şer μg konsantrasyonda jelle yüklenmiş her evreye ait örneklerin Periyodik asit-Schiff boyama ile total glikoprotein bantlanmaları Şekil 4.31'deki gibidir.



Şekil 4.31. Total Glikoproteinlerin SDS-PAGE Jelde Periyodik Asit-Schiff Boyanması. M; Marker, 3; 3.Evre, 5; 5.Evre, Hpp; Hareketsiz Prepupa, P; Pupa, B; BSA, F; Fetuin.

Coomassie mavisi boyamasına paralel olarak eşit konsantrasyonda protein yüklenen kuyucuklarda en yoğun glikoprotein bantlanması hareketsiz prepupal evre örneklerinde gözükmiştir. 3.evre ve 5.evre larval döneme ait örneklerde bantlanma elde edilememiştir. Hareketsiz prepupal evrede coomassie boyama sonucu elde edilen 70-100 kDa civarındaki yoğun protein bantlanma bölgesinde glikoprotein bantlanması gözükmemektedir.

5. TARTIŞMA

Holometabol böceklerde larval evreler gençlik dönemlerdir. Son larval evrenin (5.evre) sonunda artık beslenmeyen hareketsiz iri larvalar pupal evreye deri değiştirmeye hazırlanırlar. Bu dönemde larval doku ve organların yüzey örtüleri uzaklaştırılmaya başlar. Larval evrelerde doku-organ yüzey örtülerinin larval glikan profilleri değişir, hemositlerin tanıdığı yaşlı glikan profilleri şekillendirilir (Karaçalı ve ark., 2000)

Uzaklaştırılan larval örtülerin yerine yeni glikan profilleriyle ergin yüzey örtüleri şekillendirilir. Metamorfoz adı verilen bu değişikliklerin meydana geldiği dönemde; sinir sisteminde ganglionların birleşmesi, ganglionlar arası konnektiflerin kısalması gibi, ip merdiven sinir sistemi morfolojisinde belirgin değişiklikler görülür. Bu değişiklikler sırasında merkezi sinir sisteminde nöral ve glial hücrelerin yerlerinin, birbirlerine göre pozisyonlarının değişmesi meydana gelir (Pipa, 1963). Bu hücresel aktivitelerde hücrelerin yüzey örtülerini ve hücreler arası matriksi oluşturan glikoproteinler ile protoglikanların glikan kısımlarında meydana gelen değişiklikler, moleküller arası ilişkilerin kurulması veya kırılmasına izin vererek sinyal iletimiyle gelişmede önemli rol oynar. Hangi glikokonjugat ve glikan birimlerinde anlamlı değişikliklerin meydana geldiğinin bir böcekte belirlenmesi, yaşlanmanın moleküler mekanizmasını model bir organizmada çalışma olanağı sağlayacağı için önemlidir.

5.1. Monosakkarit Değişimleri

Monosakkaritlerden glukozun karşılaştırılan evreler arasında en fazla en genç dönemde (3.evre) bulunması, glukozun hem enerji kaynağı olarak kullanılacağı hem de epimerizasyonla diğer monosakkaritlere dönüşebileceğini göstermesi bakımından anlamlıdır. İkinci en bol bulunan riboz şekerin en genç (3.) evrede en bol, yaşlanan sırasıyla 5.evre (genç) ve hareketsiz prepupada (yaşlı) azalması, protein sentez derecesiyle ilişkilendirilerek yaşlanma sürecinde protein sentezinin azaldığını göstermektedir. Pupal dönemde tekrar yükselmesi (her ne kadar gençlik evresindeki kadar değilse de) ergin doku-organların yeniden yapılanması ile hücre yüzey örtüleri ve hücreler arası matriks oluşturulması için gerekli olan yeniden protein sentezini işaret eder.

En genç organizmada (3. Evre) en fazla bulunan mannoz, galaktoz, N-asetilglukozamin, fukoz, sialik asit, ksiloz/arabinoz ve riboz şekerler yaşlanma sürecinde genel olarak azalır. Yaşlı örneklerde (hareketsiz prepupa) en fazla azalma ksiloz/arabinozda (24 kat daha az) görülür. Onu galaktoz izler (17 kat daha az). Riboz ve sialik asit benzer şekilde azalırken (10 kat daha az) onu mannoz (6 kat daha az) ve fukoz (5 kat daha az) izler. N-asetilglukozamin şekerin (3.5 kat daha az) azalması en azdır. Bu değerler proteoglikanların ve glikoproteinlerin (N-bağlı glikanlar daha bol olacak şekilde) en fazla en genç örneklerde bulunduğunu gösterir. O-bağlı glikoproteinlerin başlangıç şekeri olan N-asetilgalaktozaminin 5.evre olgun (3.evreden yaşlı fakat hareketsiz prepupadan genç olan) larvadaki miktarı yaşlı organizmadan 2.5 kat daha fazladır. Bu sonuç, yaşlanmakta olan organizmada N-bağlı glikoproteinlerle proteoglikanların önemli ölçüde azalmasına karşın O-bağlı glikoproteinlerin konsantrasyonunun korunduğunu gösterir.

Galaktoz ve N-asetilglukozamin monosakkaritlerin genç ve yaşlı organizmalarda sırasıyla en yüksek ve en düşük düzeyde bulunmalarıyla polilaktozaminlerin yaşlanmayla önemli ölçüde azaldığı anlaşılmaktadır.

Fukoz şeker, genç organizmada en bol bulunarak N- ve O-bağlı glikanları çeşitlendirmektedir. Genel olarak az bulunan fukoz şekerin oldukça bol bulunması böcekler için özel olan iki fukozlu yapıların şekillendirilmesiyle ilgili olmalıdır. Fukozun incelenen evrelerde değişimi, bağlandığı monosakkarit olan N-asetilglukozamin değişimine çok benzemesi bu ilişkiyi işaret etmesi bakımından anlamlıdır.

LC-MS/MS ile sialik asit mutlak pik alanı değerlerinde görülen değişiklikleri, bağ tiplerini de tanıyan fluoresan işaretli lektinlerin dağılışı sonuçlarıyla desteklenmektedir. En fazla ışımaya tüm sialik asit çeşitlerini tanıyan LFA ile α 2,3 bağı (MAA) ve α 2,6 bağı (SNA) tanıyan lektinlerle en genç 3.evrede bulunmuş, yaşlanma ışımada önemli azalmaya neden olmuştur. PSL lektiniyle 3.evrede elde edilen en yüksek ışımaya ise bu evrede karmaşık tip N-glikanların bolluğunu işaret ederek analitik sonuçları desteklemektedir.

5.2. Glikan Profili Değişimleri

Glikokonjugatların glikan tipleri için belirleyici olan monosakkaritlerin oranlarının karşılaştırılmasıyla gelişme ve yaşlanma sürecinde N- ve O- bağlı glikoproteinler ile proteoglikanların glikozaminoglikanlarındaki değişiklikleri tanımlanmıştır. Bu oranlara göre, genç (3.) evrede N-glikanların yüksek mannoz, hibrit ve karmaşık tip N-glikanları ile polilaktozamin monosakkaritleri ve proteoglikanların heparan sülfat/heparin ile kondroitin sülfat/dermatan sülfat glikozaminoglikanları en bol bulunur. O-glikanların en bol bulunduğu evre olgun larva (5.evre)'dir. Yaşlanan *Bombyx mori* larvası sinir sisteminde tüm bu glikanlarda azalma meydana gelir. Ergin yapının şekillendiği pupal evrede ise glikanların tekrar yükselmesi, yeniden yapılanmanın olduğu gelişme evresinde glikanların görevleri olduğunu işaret eder.

5.3. Diğer Böceklerde Monosakkarit ve Glikan Profil Değişimleri

Böcek organizmalarında glikan profillerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar genel olarak azdır. Bununla beraber *Danaus plexippus* ve *Trichoplusia ni* kelebeklerinin yumurtalarında (Park et al., 1999) ve genomu bilindiği için gelişme sırasında glikanların oynadıkları rollerin araştırılması ve glikan biyosentezindeki sorumlu genlerin nasıl çalıştıklarının anlaşılması amacıyla *Drosophila melanogaster*'de hemolenf musininde (Theopold et al., 2001), embriyo ile ergin sinir sisteminde (North et al., 2006; Aoki et al., 2007; Koles et al., 2007; Tian and Ten Hagen, 2007a; Nishihara, 2010) benzer monosakkarit belirlemeleri yapılmıştır.

Glukozun en bol bulunan monosakkarit olması kelebek yumurtalarındaki yüksek bulunuşuyla (Park et al., 1999) desteklenir. Böcek yumurtalarındaki yüksek glukoz da *Bombyx mori*'de düşünüldüğü gibi embriyonik gelişme ve sonrası gençlik evrede enerji kaynağı olmasının yanında gelişme sürecinde gerekli olan glikokonjugatların glikanlarına değişmesi için kaynak oluşturabilir.

Riboz şekerin bolluğu; ipekböceği embriyo ve larval dönemlerinde proteoliziz ile lipid ve karbohidrat metabolizmasıyla ilgili genlerin proteinler şeklinde ifadelerinin, farklı gelişme safhalarında düzenlendiğinin gösterilmesiyle desteklenir (Oh et al., 2006).

Belirlenen monosakkarit birimleriyle *D.melanogaster*'de yüksek mannozlu, az mannozlu (pausimannoz), hibrit ve karmaşık tip N-glikanların bulunduğu (North et al., 2006; Aoki et al., 2007; Koles et al., 2007) bildirilmektedir. Az sayıda mannozlu tip N-glikan kelebek yumurtalarında da en bol bulunmaktadır. Daha az olarak hibrit ve karmaşık tip N-glikanlar da bulunur (Park et al., 1999).

O-bağlı glikanların varlığı, *D.melanogaster*'de (North et al., 2006; Tian and Ten Hagen, 2007a) ve kelebek yumurtalarında (Park et al., 1999) bildirilmiştir. Eksik şekillenmiş O-glikan çekirdekleri ile oluşan T ve Tn antijenleri *D.melanogaster* sinir sisteminde (Tian and Ten Hagen, 2007a) ve arı salgı musinlerinde (Garenaux et al., 2011) bildirilmiştir ve yaşlanmayla daha bol bulunurlar (Theopold et al., 2001). N-glikanlarla karşılaştırıldığında O-glikanlar daha az bulunmaktadır (North ve ark., 2006).

Glikokonjugatlarda uzayan polilaktozamin yapılarını şekillendiren galaktoz ve N-asetilglukozamin monosakkaritleri *D.melanogaster* embriyolarında az miktarda belirlenmiştir. Aynı embriyolarda hücreler arası matriks proteoglikanlarının heparan sülfat ve kondroitin sülfat glikozaminoglikanları da bulunmaktadır (Nishihara, 2010).

Çoğu *D.melanogaster*'de olmak üzere böceklerde belirlenen monosakkaritlerle N-glikan tiplerinin, O-glikanların, polilaktozaminlerin ve proteoglikanların tekrarlanan heparan sülfat ve kondroitin sülfat birimlerinin bulunuşu (Nishihara, 2010), bu çalışmada *Bombyx mori* en genç (3.evre), genç (5.evre) larva, yaşlı larva (hareketsiz prepupa) ve pupa evrelerinde bulunan monosakkarit belirlemelerini desteklemektedir. Bununla beraber monosakkaritlerin gelişme sürecinde değişiklikleri hakkında böceklerde bilinenler azdır.

Gelişmeye bağlı değişiklikleri en iyi bilinen monosakkarit sialik asittir. Böceklerde sialik asitin varlığının tartışmalarının ardından birkaç yöntemle tartışmaya yer bırakmayacak şekilde varlığı *D.melanogaster* embriyosu gelişen sinir sisteminde gösterilmiştir (Roth et al., 1992). İzleyen yıllarda analitik yöntemle ve enzimatik sindirim sonrası yüzeylerin transmisyon elektron mikroskopuyla karşılaştırılmasıyla *Galleria mellonella*'nın protorasik bezlerinde

gösterilmiştir (Karaçalı ve ark., 1997). Arkadan *Philaenus spumarius* malpigi tüplerinde tanımlanmıştır (Malykh et al., 1999). Protorasik bezlerde yaşılanan hücrelerde açığa çıkan ve histoliziz için hemositlerin tanıyıp tutunacağı şeker reseptörünü genç evrelerde kapattığı anlaşılmıştır (Karaçalı ve ark., 2000). Yaşlanma sürecinde sialik asitlerin hem miktarlarında hem de tiplerinde azalmalar olduğu gelişen böcek testislerinde (Karaçalı ve ark., 1999) gösterilmiştir. Daha sonra sialik asitlerin hem tiplerinde hem de miktarlarında yaşlanmayla meydana gelen azalmalar *G.mellonella*'nın protorasik bezlerinde belirlenmiştir. Doğal yaşlanmaya ek olarak ekdizon hormonuyla erken yaşlandırılan böceklerde benzer azalmalar meydana gelmiştir. Gençlik hormonu juvenil hormon uygulanarak gençlik süresi uzatılan böceklerde doğal gençlere yakın olacak şekilde sialik asit tipleri ve miktarlarında artma meydana gelmiştir (Karaçalı ve ark., 2010).

Gelişen sinir sisteminde ilk sialik asit tanımlarından (Roth ve ark., 1992) sonra *D.melanogaster* embriyo ve sinir sisteminde (North et al., 2006; Koles et al., 2007; Aoki et al., 2007), *Danaus plexippus* ve *Trichoplusia ni* yumurtalarında (Park et al., 1999) az miktarda sialik asit varlığı bildirilmişse de yaşlanmayla ilişkili değişiklikleri hakkında başka bilgi bulunmamaktadır.

5.4. Omurgalılarda Glikan Profil Değişimleri

Çeşitli omurgalı deney hayvanları (piliç, fare, tavşan) ve insan doku ve vücut sıvılarında monosakkarit değişiklikleri ile N-bağlı, O-bağlı glikoproteinlerle proteoglikanların normal gelişme, yaşlanma ve patolojilerin oluşmasındaki değişikliklerinin belirlenmesi yoğun şekilde çalışılmaktadır.

8 ve 16 günlük piliç embriyosu fibroblastlarında embriyonik gelişme sırasında hücre yüzey glikokonjugatlarında meydana gelen değişimler gösterilmiştir (Codogno et al., 1983). N-asetilgalaktozamin monosakkaritinin bolluğuna bakarak erken embriyoda fibroblastlar daha fazla N-bağlı glikoproteinleri içerirler. İleri embriyoda N- ve O-bağlı glikanlar benzer miktarda bulunurlar. Mannoz/galaktoz ve mannoz/N-asetilglukozamin oranlarındaki azalmaya bakarak; erken embriyoda hakim olan yüksek mannoz tip N-glikanların yerine ileri embriyoda karmaşık tiplerin bulunduğu gösterilmiştir. Karmaşık tip N-glikanların son uçlarında yer alan sialik asitlerde bu değişikliğe bağlı olarak ileri

embriyoda daha bol bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca N-asetilglukozamin/N-asetilgalaktozamin oranına bakarak, hücre farklılaşması ve yaşlanmasıyla ilişkili şekilde glikozaminoglikanların da değiştiği bildirilmiştir.

N- ve O-glikan belirleme çalışmalarıyla fare beyinde N-glikanların hakim olduğu, çekirdek 1 yapılarıyla O-glikanların %30'luk bir kısmı oluşturduğu bulunmuştur (Finne, 1997). Sinir sisteminde sinaptik yapıların şekillenmesi ve miyelinizasyonda önemli rol oynayan N-bağlı oligosakkaritler, beyin gelişmesi sırasında dramatik değişiklikler geçirmektedir (Ishii et al., 2007).

Gelişen sıçan (Oohira et al., 1986) ve fare (Burkat and Wiesmann, 1987) beyinde glikozaminoglikan bileşimleri yaşla bağlantılı olarak değişmektedir. Heparan sülfat her iki örnekte de temel glikozaminoglikandır. Gelişen embriyolarda hücre yüzey proteoglikanlarında belirgin ve hücreye özel sülfatlanmış glikozaminoglikan yapılarının gelişme sürecinde düzenlenmesi, hücre-hücre ilişkilerinin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. İlişkili olarak piliç embriyosu beyinde kondroitin sülfat zincirleri ile sülfotransferaz aktivitelerinin erken embriyoda en yüksek düzeyde, gelişme tamamlanınca düştüğü bildirilmiştir (Kitagawa et al., 1997). Bu bildirimler *B.mori*'deki bulgulara uymaktadır.

Fluoresan işaretli lektinlerle genç (3. ve 5.evreler) ve yaşlı (hareketsiz prepupa) evrelerde tespit edilen sırasıyla yüksek ve düşük ışımalara bakarak sialik asitlerin genç evrelerde yüksek ve yaşlı evrelerde düşük gözlenmesi LC-MS/MS sonuçlarını desteklediği gibi, literatürdeki genç-yaşlı tanımlamalardaki bildirimlere uygundur (Schauer, 1982; Schauer et al., 1984; Rieger et al., 1985; Reuter et al., 1988; Karaçalı ve ark., 1995a; Campanero-Rhodes et al., 1999; Karaçalı ve ark., 1999). Ayrıca *Galleria mellonella*'da benzer lektin işaretlemeleriyle $\alpha 2,3$ ve $\alpha 2,6$ bağlı sialik asitleri tanıyan lektinlerin genç evrede bol bulunması ile yaşlanan evrede $\alpha 2,3$ bağlı sialik asitleri tanıyan lektinin azalmış derecede ışımaya devam ederken, $\alpha 2,6$ bağı belirleyen ışımanın görülmemesi bulgularına (Karaçalı ve ark., 2010) uyar. $\alpha 2,3$ bağlı sialik asit genç hücrelerde daha bol bulunmakla (Vallejo et al., 2000) birlikte, $\alpha 2,6$ bağlı sialik asitin genç hücreleri tanımladığı ve yaşlanmayla yerini $\alpha 2,3$ bağlı sialik asite bıraktığı düşünülür (Sierra et al., 2001; Karaçalı ve ark., 2010) $\alpha 2,6$ bağlı sialik asitlerin

tümör hücrelerinde bol bulunması, onların α 2,3 bağlı sialik asitlerden farklı biyolojik rolleri olduğunu işaret eder (Schultz et al., 2012). Ayrıca plazma glikoproteinleri oligosakkarit dizilerinin son ucunda α 2,6 bağlı sialik asit bulunduğu çeşitli kaynaklarda bildirilmektedir (Krusius and Finne, 1977, 1978; Finne and Krusius, 1979; Finne et al., 1980; Finne, 1997).

İnsan serumundaki yeni oluşturulmuş proteinlerin yüksek derecede karmaşık glikanlara sahip olduğu ve proteinlerin görevini tamamlamasıyla birlikte sialik asit içeriklerinin azalmasıyla dolaşımdan uzaklaştırıldığı ifade edilmektedir (Preston et al., 2013). İnsan serumunda yapılan diğer çalışmalarda, karmaşık yapıdaki iki galaktozlu glikan zincirlerinin yaşlanmaya bağlı olarak galaktozlarını kaybederek kısaldığı rapor edilmiştir (Vanhooren et al., 2007,2008,2010). Benzer şekilde insan serumunda yapılmış çeşitli çalışmalarda, sialilasyonun yaşlanmayla azaldığı belirtilmiştir (Knezevic et al., 2008; Pucic et al., 2012, Finne, 1997). Bu bildirimler *B.mori*'de elde edilen sonuçlara uymaktadır.

5.5. Glikoprotein Değişimleri

Bu çalışmada genç evrelerden (3. ve 5.evre) hareketsiz prepupal döneme doğru gidildikçe protein içeriklerinin kademeli olarak artması, ipekböceği hemolenfinde karşılaştırmalı proteom analizi sonucunda, 80kDa civarındaki proteinlerin 5.larval evrenin ilk gününde görünmeye başlaması, sentezlerinin 5.larval dönemin 3.gününden itibaren artış göstermesi ve hareketsiz prepupada maksimuma eriştiği bildirimi ile örtüşmektedir (Hou et al., 2010). Bu çalışmadaki bulguları destekleyen bir diğer çalışmada, embriyonik dönem sonrası ipekböceği sinir sistemindeki aktin ve tubulinler incelenmiş ve 5.evre larvanın son dönemlerinde sinir sisteminde yüksek derecede protein sentezi olduğu bulunmuştur (Shanavas et al., 2004). Fakat pupal dönemde protein miktarları yeniden düşmüştür. Pupal dönemdeki düşüşün ganglionlar arası bağlantıların azalmasından dolayı olabileceği belirtilmiştir.

Periyodik asit-Schiff boyaması ile glikoproteinlerin değişimlerinin belirlenmesi analizlerinin sonucunda, genç organizmalarda glikoproteinler az bulunurken yaşlanan bireylerde en bol bulunduğu görülmektedir. Bu durum, pupal evrede ergin dokularını yeniden yapılandıracak olan böceklerin gerekli

glikoproteinleri depolama gereksinimi ile açıklanmaktadır. Total proteinlerin artışıyla birlikte glikoproteinlerin de arttığı söylenebilir. Genç örneklerde glikoproteinler az belirlenirken ksiloz değişikliğine bakarak glikozaminoglikanların genç evrelerde en bol bulunması, N- ve O- glikanları belirleyen sırasıyla N-asetilglukozamin ve N-asetilgalaktozamin monosakkaritlerin, glikozaminoglikanlarda daha bol bulunduğu anlaşılmaktadır. İpekböceği embriyonik ve larval dönemlerindeki 69 gen ifadesi profillerinin karşılaştırılması sonuçları da bu bulgularımızı destekler (Oh et al., 2006).

Sonuç olarak; glikokonjugat tipleri için karakteristik olan monosakkaritlerin oranlarındaki değişiklikler, N- ve O-bağlı glikanlarla polilaktozaminlerin ve glikozaminoglikanların yaşlanma sürecinde azaldıklarını göstermektedir. α 2,3 ve α 2,6 bağlı sialik asitler de benzer şekilde azalmaktadır. Protein ve glikoproteinler gittikçe artarak yaşlı larval beyinde en yüksek düzeye ulaşırken proteoglikanların glikozaminoglikanları ise tersine gittikçe azalarak en düşük düzeyde bulunmaktadır. İpekböceği sinir sistemindeki şeker değişikliklerinin yaşlanma sürecinde belirlendiği ilk çalışma olan bu doktora tezinin, yaşlanma mekanizmaları hakkında bilinenlere katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdul-Rahman, B., Ailor, E., Jarvis, D.L., Betenbaugh, M.J., and Lee, Y.C.,** 2002, β -1,4-Galactosyltransferase activity in native and engineered insect cells measured with time-resolved Eu-fluorescence, *Carbohydr. Res.*, 337:2181–2186pp.
- Acheson, A., Sunshine, J.L. and Rutishauser, U.,** 1991, NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions, *J. Cell Biol.*, 114:143–153pp.
- Ajioka, Y., Allison, L.J. and Jass, J.R.,** 1996, Significance of MUC1 and MUC2 mucin expression in colorectal cancer, *J. Clin. Pathol.*, 49:560–564pp.
- Alexander, D.A. and Dimock, K.,** 2002, Sialic acid functions in enterovirus 70 binding and infection, *J. Virol.*, 76:11265–11272pp.
- Alonso, G., Prieto, M., Legrand, A. and Chauvet, N.,** 1997, PSA-NCAM and B-50/GAP-43 are coexpressed by specific neuronal systems of the adult rat mediobasal hypothalamus that exhibit remarkable capacities for morphological plasticity, *J. Comp. Neurol.*, 384:181–199pp.
- Altmann, F., Kornfeld, G., Dalik, T., Staudacher, E. and Glossl, J.,** 1993, Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. *N*-acetylglucosaminyltransferase I and II activities in cultured lepidopteran cells, *Glycobiology*, 3:619–625pp.
- Altmann, F. and Marz, L.,** 1995, Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for α -mannosidase II, *Glycoconj. J.*, 12:150–155pp.
- Alviano, C.S., Travassos, L.R. and Schauer, R.,** 1999, Sialic acids in fungi: a minireview, *Glycoconjugate J.*, 16:545–554pp.
- Angata, T. and Varki, A.,** 2002, Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids, an evolutionary perspective, *Chem. Rev.*, 102:439–469pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aoki, K., Perlman, M., Lim, J., Cantu, R., Wells, L. and Tiemeyer, M.,** 2007, Dynamic developmental elaboration of *N*-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo, *J. Biol. Chem.* 282:9127–9142pp.
- Aoki, K., Porterfield, M., Lee, S.S., Dong, B., Nguyen, K., McGlamry, K.H. and Tiemeyer, M.,** 2008, The diversity of *O*-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling, *J. Biol. Chem.* 283:30385–30400pp.
- Apweiler, R., Hermjakob, H. and Sharon, N.,** 1999, On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database, *Biochim. Biophys. Acta*, 1473: 4–8pp.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. and Lake, R.J.,** 1999, Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science*, 284:770–776pp.
- Ashwell, G. and Morell, A.G.,** 1974, The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport circulating glycoproteins, *Adv. Enzymol.*, 41:99–128pp.
- Barbeau, D., Liang, J.J., Robitaille, Y., Quirion, R. and Srivastava, L.K.,** 1995, Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:2785–2789pp.
- Bast, R.C., Bates, S., Bredt, A.B., Desch, C.E., Fritsche, H., Fues, L., Hayes, D.F., Kemeny, N.E., Kragen, M., Jessup, J., Locker, G.Y., Macdonald, J.S., Mennel, R.G., Norton, L., Ravdin, P., Smith, T.J., Taube, S. and Winn, R.J.,** 1996, Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, 14:2843–2877pp.
- Becker, C.G., Artola, A., Gerardy Schahn, R., Decker, T., Welzl, H. and Schachner, M.,** 1996, The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation, *J. Neurosci. Res.*, 45:143–152pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Becker, D.J. and Lowe, J.B.**, 2003, Fucose: biosynthesis and biological function in mammals, *Glycobiology*, 13:41–53pp.
- Bencurova, M., Hemmer, W., Focke-Tejkl, M., Wilson, I.B. and Altmann, F.**, 2004, Specificity of IgG and IgE antibodies against plant and insect glycoprotein glycans determined with artificial glycoforms of human transferrin, *Glycobiology*, 14:457–466pp.
- Best, T., Kemps, E. and Bryan, J.**, 2005, Effects of saccharides on brain function and cognitive performance, *Nutr. Rev.*, 63:409–418pp.
- Block, T.M., Comunale, M.A., Lowman, M., Steel, L.F., Romano, P.R., Fimmel, C., Tennant, B.C., London, W.T., Evans, A.A., Blumberg, B. S., Dwek, R.A., Mattu, T.S. and Mehta, A.S.**, 2005, Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102:779–784pp.
- Boquet, I., Hitier, R., Dumas, M., Chaminade and M., Preat, T.**, 2000, Central brain postembryonic development in *Drosophila*: Implication of genes expressed at the interhemispheric junction. *J. Neurobiol.*, 42:33–48pp.
- Bollag, M., Rozycki, M.D. and Edelstein, S.J.**, 1996, Protein Methods Second Edition, *Wiley-Liss Inc.*, 416p.
- Bradford, M.M.**, 1976, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248–254pp.
- Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J.P., Estaquier, J., Huart, J.J., Ameisen, J.C., Aminoff, D. and Montreuil, J.**, 1998, Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages, *Biochimie*, 80:173-195pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Breloy, I., Schwientek, T., Lehr, S. and Hanisch, F.G.,** 2008, Glucuronic acid can extend O-linked core 1 glycans, but it contributes only weakly to the negative surface charge of *Drosophila melanogaster* Schneider-2 cells, *FEBS Lett.*, 582:1593–1598pp.
- Brunner, A., Kolarich, D., Voglmeir, J., Paschinger, K. and Wilson, I.B.,** 2006, Comparative characterisation of recombinant invertebrate and vertebrate peptide O-xylosyltransferases, *Glycoconj. J.*, 23:543-554pp.
- Bruses, J.L. and Rutishauser, U.,** 2001, Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development, *Biochimie*, 83:635–643pp.
- Burkart, T. and Wiesmann, U.N.,** 1987, Sulfated glycosaminoglycans (GAG) in the developing mouse brain. Quantitative aspects on the metabolism of total and individual sulfated GAG in vivo, *Dev Biol.*, 120(2):447-456pp.
- Butcher, E.C. and Picker, L.J.,** 1996, Lymphocyte homing and homeostasis, *Science*, 272:60–66pp.
- Butler, A.K., Uryu, K. and Chesselet, M.F.,** 1998, A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum, *Dev. Neurosci.*, 20:253–262pp.
- Butters, T.D. and Hughes, R.C.,** 1981, Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 640:655–671pp.
- Campanero-Rhodes, M.A., Solís, D., Carrera, E., de la Cruz, M.J. and Díaz-Mauriño, T.,** 1999, Rat liver contains age regulated cytosolic 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid (Kdn), *Glycobiology*, 9(6):527-532pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R.J. and Schnaar, R.L.,** 2000, A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice, *Exp. Neurol.*, 166:227–234pp.
- Chrambach, A., Reisfeld, R.A., Wyckoff, M. and Zaccari, J.,** 1967, A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 20:150–154pp.
- Ciarlet, M., Crawford, S.E. and Estes, M.K.,** 2001, Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid dependent and sialic acid-independent rotavirus strains, *J. Virol.*, 75:11834– 11850pp.
- Cipollo, J.F., Awad, A.M., Costello, C.E. and Hirschberg, C.B.,** 2005, *N*-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages, *J. Biol. Chem.*, 280:26063–26072pp.
- Codogno, P., Bernard, B., Font, J. and Aubery, M.,** 1983, Changes in protein glycosylation during chick embryo development, *Biochim. Biophys. Acta*, 763(3):265-275pp.
- Collins, B.E., Kiso, M., Hasegawa, A., Tropak, M.B., Roder, J.C., Crocker, P. R. and Schnaar, R.L.,** 1997, Binding specificities of the sialoadhesin family of I-type lectins. Sialic acid linkage and substructure requirements for binding of myelin-associated glycoprotein, Schwann cell myelin protein, and sialoadhesin, *J. Biol. Chem.*, 272:16889– 16895pp.
- Corfield, A.P. and Schauer, R.,** 1982a., Occurrence of sialic acids, In: Schauer, R. (Ed.), *Sialic Acids—Chemistry, Metabolism and Function*, Springer Verlag Wien, New York, 5–50pp.
- Corfield, A.P. and Schauer, R.,** 1982b, Metabolism of sialic acids, In: Schauer, R. (Ed.), *Sialic Acids—Chemistry, Metabolism and Function*, Springer Verlag Wien, New York, 195–261pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Corfield, A.P., Williams, A.J.K., Clamp, J.R., Wagner, S.A. and Mountford, R.A.,** 1988, Degradation by bacterial enzymes of colonic mucus from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease: the role of sialic acid metabolism and the detection of a novel O-acetylsialic acid esterase, *Clin. Sci.*, 74:71–78pp.
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., Barthels, D., Rajewsky, K. and Wille, W.,** 1994, Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning, *Nature*, 367:455–459pp.
- Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C. and Represa, A.,** 1997, NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus, *Mol. Cell. Neurosci.*, 8:323–335pp.
- Cremer, H., Chazal, G., Carleton, A., Goridis, C., Vincent, J.D. and Lledo, P.M.,** 1998, Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:13242–13247pp.
- Cremer, H., Chazal, G., Lledo, P.M., Rougon, G., Montaron, M.F., Mayo, W., Le Moal, M. and Abrous, D.N.,** 2000, PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 18:213–220pp.
- Crocker, P.R., Kelm, S., Dubois, C., Martin, B., McWilliam, A.S., Shotton, D.M., Paulson, J.C. and Gordon, S.,** 1991, Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages, *EMBO J.*, 10:1661-1669pp.
- Crocker, P.R., Kelm, S., Hartnell, A., Freeman, S., Nath, D., Vinson, M. and Mucklow, S.,** 1996, Sialoadhesin and related cellular recognition molecules of the immunoglobulin superfamily, *Biochem. Soc. Trans.*, 24:150–156pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Crocker, P. R., Hartnell, A., Munday, J. and Nath, D.,** 1997, The potential role of sialoadhesin as a macrophage recognition molecule in health and disease, *Glycoconjugate J.*, 14:601–609pp.
- Crocker, P.R., Clark, E.A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J.H., Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J., Schnaar, R.L., Sgroi, D.C., Stamenkovic, I., Schauer, R., Schachner, M., van den Berg, T.K., van der Merwe, P.A., Watt, S.M. and Varki, A.,** 1998, Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins, *Glycobiology*, 8:5-6pp.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C. and Varki, A.,** 2007, Siglecs and their roles in the immune system, *Nat. Rev. Immunol.*, 7:255–266pp.
- D’Amico, P. and Jacobs, J.R.,** 1995, Lectin histochemistry of the *Drosophila* embryo, *Tissue Cell.*, 27:23–30pp.
- Dasgupta, U., Dixit, B.L., Rusch, M., Selleck, S. and The, I.,** 2007, Functional conservation of the human EXT1 tumor suppressor gene and its *Drosophila* homolog *tout velu*, *Dev. Genes Evol.*, 217:555–561pp.
- Davis, T.R., Schuler, M.L., Granados, R.R. and Wood, H.A.,** 1993, Comparison of oligosaccharide processing among various insect cell lines expressing a secreted glycoprotein, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 29A:842–846pp.
- DeBellard, M.E., Tang, S., Mukhopadhyay, G., Shen, Y.J. and Filbin, M.T.,** 1996, Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein, *Mol. Cell. Neurosci.*, 7:89–101pp.
- Deveci, R., Balcan, E., Keskin, N., Ün, C. ve Karaçalı, S.,** 2010, Embriyoda Cinsiyetin Belirlendiği Süreçte Antimüller Hormonda Sialik Asit Değişiklikleri ile Müller Kanalında Apoptozis İlişkisinin Araştırılması Tübitak Projesi, Proje No: 107T129, 234s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dityatev, A., Dityateva, G., Sytnyk, V., Delling, M., Toni, N., Nikonenko, I., Muller, D. and Schachner, M.,** 2004, Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses, *J. Neurosci.*, 24:9372–9382pp.
- Doerner, K.C. and White, B.A.,** 1990, Detection of Glycoproteins Separated by Nondenaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis Using the Periodic Acid-Schiff Stain, *Analytical Biochemistry*, 187:147-150pp.
- Edelman, G.M.,** 1986, Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 2:81–116pp.
- EY Laboratories,** 2007, Lectin and Lectin Conjugates Catalog, 112p.
- Fabini, G., Freilinger, A., Altmann, F. and Wilson, I.B.,** 2001, Identification of core α 1,3-fucosylated glycans and cloning of the requisite fucosyltransferase cDNA from *Drosophila melanogaster*. Potential basis of the neural anti-horseradish peroxidase epitope, *J. Biol. Chem.*, 276:28058–28067pp.
- Faillard, H. and Schauer, R.,** 1972, Glycoproteins as lubricants, protective agents, carriers, structural proteins and as participants in other functions, In: Gottschalk, A. (Ed.), *Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function*, BBA Library 5. *Elsevier Publ. Company*, Amsterdam, 1246–1267pp.
- Filbin, M.T.,** 1995, Myelin-associated glycoprotein: a role in myelination and in the inhibition of axonal regeneration?, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5:588–595pp.
- Finne, J. and Krusius, T.,** 1979, Structural features of the carbohydrate units of plasma glycoproteins, *Eur. J. Biochem.*, 102, 583-588pp.
- Finne, J., Tao, T.W. and Burger, M.M.,** 1980, Carbohydrate changes in glycoproteins of a poorly metastasizing wheat germ agglutinin-resistant melanoma clone, *Cancer Res.*, 40:2580-2587pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Finne, J.**, 1997, Carbohydrate units of nervous tissue glycoproteins, J. Montreuil, J.F.G. Vliegthart and H. Schachter (Eds.), *Glycoproteins II*, Elsevier Science B.V., 652p.
- Fischer, C., Kelm, S., Ruch, B. and Schauer, R.**, 1991, Reversible binding of sialidase-treated rat lymphocytes by homologous peritoneal macrophages, *Carbohydr. Res.*, 213:263-273pp.
- Fredieu, J.R. and Mahowald, A.P.**, 1994, Glycoconjugate expression during *Drosophila* embryogenesis. *Acta Anat.* 149:89–99pp.
- Gabius, H.J., Andre, S., Kaltner, H. and Siebert, H.C.**, 2002, The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1572:165-177pp.
- Gagneux, P. and Varki, A.**, 1999, Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function, *Glycobiology*, 9:747–755pp.
- Gama, C.I. and Hsieh-Wilson, L.C.**, 2005, Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9:609–619pp.
- Garenaux, E., Maes, E., Levêque, S., Brassart, C. and Guerardel, Y.**, 2011, Structural characterization of complex O-linked glycans from insect-derived material, *Carbohydr Res.*, 346(9):1093-1104pp.
- Gee, G.V., Dugan, A.S., Tsomaia, N., Mierke, D.F. and Atwood, W.J.**, 2006, The role of sialic acid in human polyomavirus infections, *Glycoconjugate J.*, 23:19–26pp.
- Goto, S., Taniguchi, M., Muraoka, M., Toyoda, H., Sado, Y., Kawakita, M. and Hayashi, S.**, 2001, UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch, *Nat. Cell Biol.*, 3:816-822pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guruge, J.L., Falk, P.G., Lorenz, R.G., Dans, M., Wirth, H.P., Blaser, M.J., Berg, D.E. and Gordon, J.I.,** 1998, Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:3925–3930pp.
- Hacker, U., Nybakken, K. and Perrimon, N.,** 2005, Heparan sulphate proteoglycans: The sweet side of development, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 6:530–541pp.
- Haecker, A., Bergman, M., Neupert, C., Moussian, B., Luschnig, S., Aebi, M. and Mannervik, M.,** 2008, Wollknauel is required for embryo patterning and encodes the *Drosophila* ALG5 UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase, *Development*, 135:1745–1749pp.
- Haines, N. and Irvine, K.D.,** 2003, Glycosylation regulates Notch signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4:786–797pp.
- Haltiwanger R.S. and Lowe, J.B.,** 2004, Role of glycosylation in development, *Annu. Rev. Biochem.*, 73:491–537pp.
- Hammond, M.S.L., Sims, C., Parameshwaran, K., Suppiramaniam, V., Schachner, M. and Dityatev, A.,** 2006, Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid inhibits NR2B containing N-methyl-D-aspartate receptors and prevents glutamate induced cell death, *J. Biol. Chem.*, 281:34859–34869pp.
- Han, C., Belenkaya, T.Y., Khodoun, M., Tauchi, M., Lin, X. and Lin, X.,** 2004, Distinct and collaborative roles of *Drosophila* EXT family proteins in morphogen signalling and gradient formation, *Development*, 131:1563–1575pp.
- Hanneman, A.J., Rosa, J.C., Ashline, D. and Reinhold, V.N.,** 2006, Isomer and glycomer complexities of core GlcNAcs in *Caenorhabditis elegans*, *Glycobiology*, 16:874–890pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hemmer, W., Focke, M., Kolarich, D., Wilson, I.B., Altmann, F., Wohrl, S., Gotz, M. and Jarisch, R.,** 2001, Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging insect allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108:1045–1052pp.
- Hollister, J.R., Shaper, J.H. and Jarvis, D.L.,** 1998, Stable expression of mammalian β 1,4-galactosyltransferase extends the *N*-glycosylation pathway in insect cells, *Glycobiology*, 8:473–480pp.
- Hollister, J.R. and Jarvis, D.L.,** 2001, Engineering lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian β 1,4-galactosyltransferase and α -2,6-sialyltransferase genes, *Glycobiology*, 11:1–9pp.
- Hooker, A.D., Green, N.H., Baines, A.J., Bull, A.T., Jenkins, N., Strange, P.G. and James, D.C.,** 1999, Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-gamma in Chinese hamster ovary and insect cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 63:559–572pp.
- Hooper, L.V. and Gordon, J.I.,** 2001, Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity, *Glycobiology*, 11:1–10pp.
- Hou, Y., Zou, Y., Wang, F., Gong, J., Zhong, X., Xia, Q. and Zhao, P.,** 2010, Comparative analysis of proteome maps of silkworm hemolymph during different developmental stages, *Proteome Sci.*, 8:45-55pp.
- Hsieh, P. and Robbins, P.W.,** 1984, Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing. Oligosaccharide processing in *Aedes albopictus* mosquito cells, *J. Biol.Chem.*, 259:2375–2382pp.
- Hu, H.Y., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. and Rutishauser, U.,** 1996, The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone, *Neuron*, 16:735–743pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huberman, K., Peluso, R.W. and Moscona, A.,** 1995, Hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza 3: role of the neuraminidase in the viral life cycle, *Virology*, 214:294– 300pp.
- Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Suzuki, A.,** 1998, The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans, *J. Biol. Chem.*, 273:15866–15871pp.
- Ishii, A., Ikeda, T., Hitoshi, S., Fujimoto, I., Torii, T., Sakuma, K., Nakakita, S., Hase, S. and Ikenaka, K.,** 2007, Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex, *Glycobiology*, 3:261-276pp.
- Ito, T., Suzuki, Y., Suzuki, T., Takada, A., Horimoto, T., Wells, K., Kida, H., Otsuki, K., Kiso, M., Ishida, H. and Kawaoka, Y.,** 2000, Recognition of N-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the α 2,3linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks, *J. Virol.*, 74:9300–9305pp.
- Izumikawa, T., Egusa, N., Taniguchi, F., Sugahara, K. and Kitagawa, H.,** 2006, Heparan sulfate polymerization in *Drosophila*, *J. Biol. Chem.*, 281:1929-1934pp.
- Jaeken, J. and Matthijs, G.,** 2007, Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 8:261–278pp.
- Jancik, J. and Schauer, R.,** 1974, Sialic acid - a determinant of the life-time of rabbit erythrocytes, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355:395-400pp.
- Jork, R., Smalla, K.H., Karsten, U., Grecksch, G., Ruthrich, H.L. and Matthies, H.,** 1991, Monoclonal antibody specific for histo-blood group antigens H (types 2 and 4) interferes with long-term memory formation in rats, *Neurosci. Res. Commun.*, 8:21–27pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kalela, A., Ponnio, M., Koivu, T.A., Hoyhtya, M., Huhtala, H., Sillanaukea, P. and Nikkari, S.T.**, 2000, Association of serum sialic acid and MMP-9 with lipids and inflammatory markers, *Eur. J. Clin. Invest.*, 30:99–104pp.
- Kalovidouris, S.A., Gama, C.I., Lee, L.W. and Hsieh-Wilson, L.C.**, 2005, A role for fucose alpha(1-2) galactose carbohydrates in neuronal growth, *J. Am. Chem. Soc.*, 127:1340–1341pp.
- Kamimura, K., Koyama, T., Habuchi, H., Ueda, R., Masu, M., Kimata, K. and Nakato, H.**, 2006, Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in *Drosophila* FGF signaling, *J. Cell Biol.*, 174:773–778pp.
- Kaneko, M., Kudo, T., Iwasaki, H., Ikehara, Y., Nishihara, S., Nakagawa, S., Sasaki, K., Shiina, T., Inoko, H., Saitou, N. and Narimatsu, H.**, 1999, Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse, molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX, *FEBS Lett.*, 452:237–242pp.
- Karaçalı, S., Deveci, Ö., Deveci, R., Onat, T. and Gürcü, B.**, 1995a, Spectrophotometrical determination of sialic acid in several tissues of isolated and crowded *Locusta migratoria* (Orthoptera), *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.*, 58: 47-57pp.
- Karaçalı, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T. and Gürcü, B.**, 1995b, Spectrophotometrical determination of sialic acid in the tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.*, 58:59-67pp.
- Karaçalı, S., Kırmızıgül, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T. and Gürcü, B.**, 1997, Presence of sialic acid in prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Tissue and Cell*, 29:315-321pp.
- Karaçalı, S., Kırmızıgül, S. and Deveci, R.**, 1999, Sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Invertebr. Reprod. Dev.*, 35(3):225-229pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karaçalı, S., Deveci, R., Pehlivan, S. and Özcan, A.,** 2000, Adhesion of hemocytes to desialylated prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in larval stage, *Invertebr. Reprod. Dev.*, 37(2): 167-170pp.
- Karaçalı, S., Kırmızıgül, S., Deveci, R. and Deveci, Ö.,** 2003, Presence of sialic acid in the hemolymph of *Dociostaurus maroccanus* Thun. (Orthoptera: Acrididae), *Invertebr. Reprod. Dev.*, 43(2): 91-94pp.
- Karaçalı, S., Deveci, R., İzzetoğlu, S., Yıkılmaz, M.S., Şahar, U., Deveci, Ö., Tarhan, L. ve Ayar Kayalı, H.,** 2010, Doğal genç-yaşlı ve deneysel yaşlandırılmış-gençleştirilmiş böcek model sistemde hücre ve organizma düzeyinde yaşlanmanın moleküler mekanizması, DPT Proje No: 06-DPT-03, 102s.
- Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G. and Lowe, J.B.,** 1995, Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the nonsecretor phenotype, *J. Biol. Chem.*, 270:4640–4649pp.
- Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M.T., Tang, S., Debellard, M.E., Schnaar, R.L., Mahoney, J.A., Hartnell, A., Bradfield, P. and Crocker, P. R.,** 1994, Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, *Curr. Biol.*, 4:965–972pp.
- Kelm, S. and Schauer, R.,** 1997, Sialic acids in molecular and cellular interactions, *In. Int. Rev. Cytology*, 175:137-140pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, B.T., Tsuchida, K., Lincecum, J., Kitagawa, H., Bernfield, M. and Sugahara, K.,** 2003, Identification and characterization of three *Drosophila melanogaster* glucuronyltransferases responsible for the synthesis of the conserved glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. Two novel homologs exhibit broad specificity toward oligosaccharides from proteoglycans, glycoproteins, and glycosphingolipids, *J. Biol. Chem.*, 278:9116-9124pp.
- Kim, Y.J. and Varki, A.,** 1997, Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer, *Glycoconjugate J.*, 14:569-576pp.
- Kim, Y.J., Borsig, L. and Varki, N.M.,** Varki, A., 1998, P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:9325-9330pp.
- Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Tone, Y. and Sugahara, K.,** 1997, Developmental regulation of the sulfation profile of chondroitin sulfate chains in the chicken embryo brain, *J. Biol. Chem.*, 272(50):31377-31381pp.
- Kleene, R. and Schachner, M.,** 2004, Glycans and neural cell interactions, *Nat. Rev. Neurosci.*, 5:195-208pp.
- Klein, A., Diaz, S., Ferreira, I., Lamblin, G., Roussel, P. and Manzi, A.E.,** 1997, New sialic acids from biological sources identified by a comprehensive and sensitive approach: liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) of SILA quinoxalinones, *Glycobiology*, 7:421-432pp.
- Knezevic, A., Polasek, O., Gornik, O., Rudan, I., Campbell, H., Hayward, C., Wright, A., Kolcic, I., O'Donoghue, N., Bones, J., Rudd, P.M. and Lauc, G.,** 2009, Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome, *J. Proteome Res.*, 8(2):694-701pp.
- Koles, K., Irvine, K.D. and Panin, V.M.,** 2004, Functional characterization of *Drosophila* sialyltransferase, *J. Biol. Chem.*, 279:4346-4357pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koles, K., Lim, J.M., Aoki, K., Porterfield, M., Tiemeyer, M., Wells, L. and Panin, V.M.,** 2007, Identification of *N*-glycosylated proteins from the central nervous system of *Drosophila melanogaster*, *Glycobiology*, 17:1388–1403pp.
- Krusius, T. and Finne, J.,** 1977, Structural features of tissue glycoproteins. Fractionation and methylation analysis of glycopeptides derived from rat brain, kidney and liver, *Eur. J. Biochem.*, 78:369–379pp.
- Krusius, T. and Finne, J.,** 1978, Characterization of a novel sugar sequence from rat-brain glycoproteins containing fucose and sialic acid, *Eur. J. Biochem.* 84:395-403pp.
- Kudo, T., Fujii, T., Ikegami, S., Inokuchi, K., Takayama, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Togayachi, A., Takahashi, S., Tachibana, K., Yuasa, S. and Narimatsu, H.,** 2007, Mice lacking alpha1,3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis x structure in brain and increased anxiety-like behaviors, *Glycobiology*, 17:1-9pp.
- Kuhn, H.G., Dickinson Anson, H. and Gage, F. H.,** 1996, Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation, *J. Neurosci.*, 16:2027–2033pp.
- Larsen, R.D., Ernst, L.K., Nair, R.P. and Lowe, J.B.,** 1990, Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose: beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:6674–6678pp.
- Lee, H., Kelm, S., Michalski, J.C. and Schauer, R.,** 1990, Influence of sialic acids on the galactose-recognizing receptor of rat peritoneal macrophages, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 371:307-316pp.
- Lei, L., Xu, A.G., Panin, V.M. and Irvine, K.D.,** 2003, An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation, *Development*, 130:6411–6421pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leonard, R., Rendic, D., Rabouille, C., Wilson, I.B., Preat, T. and Altmann, F.,** 2006, The *Drosophila* fused lobes gene encodes an *N*-acetylglucosaminidase involved in *N*-glycan processing, *J. Biol. Chem.*, 281:4867–4875pp.
- Li, C.M., Tropak, M.B., Gerlai, R., Clapoff, S., Abramownewerly, W., Trapp, B., Peterson, A. and Roder, J.,** 1994, Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein, *Nature*, 369:747–750pp.
- Li, Y.X., Li, L., Irvine, K.D. and Baker, N.E.,** 2003, Notch activity in neural cells triggered by a mutant allele with altered glycosylation, *Development*, 130:2829–2840pp.
- Lin, X., Buff, E.M., Perrimon, N. and Michelson, A.M.,** 1999, Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development, *Development*, 126:3715–3723pp.
- Listinsky, J.J., Siegal, G.P. and Listinsky, C.M.,** 1998, Alpha-L-fucose: a potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia, *Am. J. Clin. Pathol.*, 110:425–440pp.
- Lopez, M., Tetaert, D., Juliant, S., Gazon, M., Cerutti, M., Verbert, A. and Delannoy, P.,** 1999, O-glycosylation potential of lepidopteran insect cell lines, *Biochim. Biophys. Acta*, 1427:49–61pp.
- Louvi, A. and Artavanis-Tsakonas, S.,** 2006, Notch signalling in vertebrate neural development, *Nat. Rev. Neurosci.*, 7:93–102pp.
- Lowe, J.B.,** 1993, The blood group-specific human glycosyltransferases, *Baillieres Clin. Haematol.*, 6:465–492pp.
- Lowe, J.B.,** 1997, Selectin ligands, leukocyte trafficking, and fucosyltransferase genes, *Kidney Int.*, 51:1418–1426pp.
- Lowe, J.B.,** 2003, Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15:531–538pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lu, L.C. and Stanley, P.**, 2006, In *Functional Glycomics*, Fukuda, M., Ed., Methods in Enzymology, Elsevier: Amsterdam, Vol 417, 355p.
- Luo, Y., Koles, K., Vorndam, W., Haltiwanger, R.S. and Panin, V.M.**, 2006, Protein O-fucosyltransferase 2 adds O-fucose to thrombospondin type 1 repeats, *J. Biol. Chem.*, 281:9393–9399pp.
- Macartney, J. C.**, 1987, Fucose-containing antigens in normal and neoplastic human gastric mucosa: a comparative study using lectin histochemistry and blood group immunohistochemistry, *J. Pathol.*, 152:23–30pp.
- Malykh, Y.N., Krisch, B., Gerardy-Schahn, R., Lapina, E.B., Shaw, L. and Schauer, R.**, 1999, The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*, *Glycoconjugate J.*, 16:731–739pp.
- Malykh, Y.N., Schauer, R. and Shaw, L.**, 2001, N-Glycolylneuraminic acid in human tumours, *Biochimie*, 83:623–634pp.
- Mikkonen, M., Soininen, H., Tapiola, T., Alafuzoff, I. and Miettinen, R.**, 1999, Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation, *Eur. J. Neurosci.*, 11:1754–1764pp.
- Miyake, M., Taki, T., Hitomi, S. and Hakomori, S.**, 1992, Correlation of expression of H/Le(y)/Le(b) antigens with survival in patients with carcinoma of the lung, *N. Engl. J. Med.*, 327:14–18pp.
- Miyoshi, E., Noda, K., Yamaguchi, Y., Inoue, S., Ikeda, Y., Wang, W.G., Ko, J. H., Uozumi, N., Li, W. and Taniguchi, N.**, 1999, The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance, *Biochim. Biophys. Acta*, 1473:9–20pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moloney, D.J., Shair, L., Lu, F.M., Xia, J. and Locke, R.,** 2000b, Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules, *J. Biol. Chem.*, 275:9604–9611pp.
- Montag, D., Giese, K. P., Bartsch, U., Martini, R., Lang, Y., Bluthmann, H., Karthigasan, J., Kirschner, D. A., Wintergerst, E. S., Nave, K. A., Zielasek, J., Toyka, K. V., Lipp, H. P. and Schachner, M.,** 1994, Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin, *Neuron*, 13:229–246pp.
- Morimoto, N., Nakano, M., Kinoshita, M., Kawabata, A., Morita, M., Oda, Y., Kuroda, R. and Kakehi, K.,** 2001, Specific distribution of sialic acids in animal tissues as examined by LC-ESI-MS after derivatization with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene, *Anal. Chem.*, 73(22):5422-5428pp.
- Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F.S., Crocker, P.R. and Filbin, M.T.,** 1994, A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration, *Neuron*, 13:757–767pp.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G. and Kiss, J.Z.,** 1996, PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity, *Neuron*, 17:413–422pp.
- Muller, E., Schroder, C., Sharon, N. and Schauer, R.,** 1983, Binding and phagocytosis of sialidase-treated rat erythrocytes by a mechanism independent of opsonins, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 364:1410-1420pp.
- Muramatsu, T.,** 2000, Essential roles of carbohydrate signals in development, immune response and tissue functions, as revealed by gene targeting, *J. Biochem.*, 127:171–176pp.
- Murphy, K.J. and Regan, C.M.,** 1998, Contributions of cell adhesion molecules to altered synaptic weightings during memory consolidation, *Neurobiol. Learn. Mem.*, 70:73–81pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Murrey, H.E., Gama, C.I., Kalovidouris, S.A., Luo, W.I., Driggers, E.M., Porton, B. and Hsieh-Wilson, L.C.,** 2006, Protein fucosylation regulates synapsin Ia/Ib expression and neuronal morphology in primary hippocampal neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103:21–26pp.
- Murrey, H.E. and Hsieh-Wilson, L.C.,** 2008, The Chemical Neurobiology of Carbohydrates, *Chem. Rev.*, 108:1708–1731pp.
- Mühlenhoff, M., Eckhardt, M. and Gerardy-Schahn, R.,** 1998, Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8:558–564pp.
- Nakamura, Y., Haines, N., Chen, J., Okajima, T., Furukawa, K., Urano, T., Stanley, P., Irvine, K.D. and Furukawa, K.,** 2002, Identification of a *Drosophila* gene encoding xylosylprotein beta4-galactosyltransferase that is essential for the synthesis of glycosaminoglycans and for morphogenesis, *J. Biol. Chem.*, 277:46280–46288pp.
- Nakanishi, S.,** 1994, Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity, *Neuron*, 13:1031–1037pp.
- Natsuka, S. and Lowe, J.B.,** 1994, Enzymes involved in mammalian oligosaccharide biosynthesis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4:683–691pp.
- Nishihira, J.,** 1998, Novel pathophysiological aspects of macrophage migration inhibitory factor (review), *Int. J. Mol. Med.*, 2:17–28pp.
- Nishihara, S., Iwasaki, H., Kaneko, M., Tawada, A., Ito, M. and Narimatsu, H.,** 1999, Alpha1,3-fucosyltransferase 9 (FUT9, Fuc-TIX) preferentially fucosylates the distal GlcNAc residue of polylactosamine chain while the other four alpha1,3FUT members preferentially fucosylate the inner GlcNAc residue, *FEBS Lett.*, 462:289–294pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nishihara, S.**, 2010, Glycosyltransferases and transporters that contribute to proteoglycan synthesis in *Drosophila*: Identification and functional analyses using the heritable and inducible RNAi system, *Methods Enzymol.*, 480:323-351pp.
- North, S.J., Koles, K., Hembd, C., Morris, H.R., Dell, A., Panin, V.M. and Haslam, S.M.**, 2006, Glycomics studies of *Drosophila melanogaster* embryos, *Glycoconj. J.*, 23:345–354pp.
- Nybakken, K. and Perrimon, N.**, 2002, Heparan sulfate proteoglycan modulation of developmental signaling in *Drosophila*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1573:280-291pp.
- Oh, J.H., Jeon, Y.J., Jeong, S.Y., Hong, S.M., Lee, J.S., Nho, S.K., Kang, S.W. and Kim, N.S.**, 2006, Gene expression profiling between embryonic and larval stages of the silkworm, *Bombyx mori*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 343(3):864-872pp.
- Ohtsubo, K. and Marth, J.D.**, 2006, Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, *Cell*, 126:855–867pp.
- Okajima, T. and Irvine, K.D.**, 2002, Regulation of notch signaling by O-linked fucose, *Cell*, 111:893–904pp.
- Oohira, A., Matsui, F., Matsuda, M. and Shoji, R.**, 1986, Developmental change in the glycosaminoglycan composition of the rat brain, *J. Neurochem.*, 47:588-593pp.
- Orntoft, T. F. and Vestergaard, E.M.**, 1999, Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer, *Electrophoresis*, 20:362–371pp.
- Park, Y.I., Wood, H.A. and Lee, Y.C.**, 1999, Monosaccharide compositions of *Danaus plexippus* (monarch butterfly) and *Trichoplusia ni* (cabbage looper) egg glycoproteins, *Glycoconj. J.*, 16(10):629-638pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Parker, G.F., Williams, P.J., Butters, T.D. and Roberts, D.B.,** 1991, Detection of the lipid linked precursor oligosaccharide of N-linked protein glycosylation in *Drosophila melanogaster*, *FEBS Lett.*, 290:58–60pp.
- Parlak, O.,** 2001, İpekböceği Biyolojisi (Yardımcı Ders Kitabı), *Ege Üniversitesi Basımevi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, 171, İzmir, 147s.
- Paschinger, K., Gutternigg, M., Rendic, D. and Wilson, I.B.,** 2008, The N-glycosylation pattern of *Caenorhabditis elegans*, *Carb. Res.*, 343:2041–2049pp.
- Pipa, R.L.,** 1963, Studies on the hexapod nervous system. VII.Ventral nerve cord shortening; a metamorphic process in *Galleria mellonella* (L.), *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 63:405-417pp.
- Prenner, C., Mach, L., Glossl, J. and Marz, L.,** 1992, The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein, honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of α 1,3-fucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine, *Biochem., J.*, 284:377–380pp.
- Preston, R.J., Rawley, O., Gleeson, E.M. and O'Donnell, J.S.,** 2013, Elucidating the role of carbohydrate determinants in regulating hemostasis: insights and opportunities, *Blood*, 121(19):3801-3810pp.
- Pucic, M., Muzinic, A., Novokmet, M., Skledar, M., Pivac, N., Lauc, G. and Gornik, O.,** 2012, Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence, *Glycobiology*, 22(7):975-982pp.
- Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J.F., Nita-Lazar, A., Kosik, K.S. and Haltiwanger, R.S.,** 2005, Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function, *J. Biol. Chem.*, 280:32133–32140pp.
- Rampal, R., Luther, K.B. and Haltiwanger, R.S.,** 2007, Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation, *Curr. Mol. Med.*, 7:427–445pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ren, J., Bretthauer, R.K. and Castellino, F.J.,** 1995, Purification and properties of a Golgi derived (α 1,2)-mannosidase-I from baculovirus-infected lepidopteran insect cells (IPLB-SF21AE) with preferential activity toward mannose 6-*N*-acetylglucosamine2, *Biochemistry*, 34:2489–2495pp.
- Reuter, G., Kelm, S. and Schauer, R.,** 1988, Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates, *Acta Histochemica, Suppl. Band*, 36: 51-79pp.
- Rexach, J.E., Clark, P.M. and Hsieh-Wilson, L.C.,** 2008, Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain, *Nat. Chem. Biol.*, 4:97–106pp.
- Rieger, F., Grumet, M. and Edelman, G.M.,** 1985, N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction, *J. Cell. Biol.*, 101(1):285-293pp.
- Rodrigues, M.L., Dobroff, A.S.S., Dos, S.S., Couceiro, J.N., Alviano, C.S., Schauer, R. and Travassos, L.R.,** 2003, Sialylglycoconjugates and sialyltransferase activity in the fungus *Cryptococcus neoformans*, *Glycoconjugate J.*, 19:165–173pp.
- Rose, S.P.R. and Jork, R.,** 1987, Long-term memory formation in chicks is blocked by 2-deoxygalactose, a fucose analog, *Behav. Neural Biol.*, 48:246–258pp.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R. and Gehring, W.J.,** 1992, Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 256(5057):673-675pp.
- Rudd, P.M., Merry, A.H., Wormald, M.R. and Dwek, R.A.,** 2002, Glycosylation and prion protein, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12:578–586pp.
- Rutishauser, U. and Landmesser, L.,** 1996, Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions, *Trends Neurosci.*, 19:422– 427pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sagami, H. and Lennarz, W.J.**, 1987, Glycoprotein synthesis in *Drosophila* Kc cells. Biosynthesis of dolichol-linked saccharides, *J. Biol. Chem.*, 262, 15610-15617pp.
- Saito, M., Kitamura, H. and Sugiyama, K.**, 2001, Occurrence of gangliosides in the common squid and pacific octopus among protostomia, *Biochim. Biophys. Acta*, 1511:271–280pp.
- Salinska, E., Bourne, R.C. and Rose, S.P.R.**, 2004, Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task, *Eur. J. Neurosci.*, 19:3042–3047pp.
- Sandi, C., Rose, S.P.R., Mileusnic, R. and Lancashire, C.**, 1995, Corticosterone facilitates long-term memory formation via enhanced glycoprotein synthesis, *Neuroscience*, 69:1087–1093pp.
- Sarkar, M. and Schachter, H.**, 2001, Cloning and expression of *Drosophila melanogaster* UDP-GlcNAc:α-3-D-mannoside β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I, *Biol. Chem.*, 382:209–217pp.
- Sarkar, M., Leventis, P.A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Schachter, H. and Boulianne, G.L.**, 2006, Null mutations in *Drosophila* N-acetylglucosaminyltransferase I produce defects in locomotion and a reduced life span, *J. Biol. Chem.*, 281:12776–12785pp.
- Sasamura, T., Sasaki, N., Miyashita, F., Nakao, S., Ishikawa, H.O., Ito, M., Kitagawa, M., Harigaya, K., Spana, E., Bilder, D., Perrimon, N. and Matsuno, K.**, 2003, Neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions, *Development*, 130:4785–4795pp.
- Schachner, M. and Bartsch, U.**, 2000, Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin, *Glia*, 29:154–165pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schachter, H.**, 2002, *N*-Acetylglucosaminyltransferase-II, in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, Vol., Taniguchi, K.H.N., and Fukuda, M., Eds., *Springer*, Tokyo, Japan, 70–79pp.
- Schauer, R.**, 1982a, Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40:131-234pp.
- Schauer, R.**, 1982b, Sialic Acids - Chemistry, Metabolism and Function, *Cell Biology Monogr.*, Springer, Wien-New York, Vol. 10., 344p.
- Schauer, R. and Vliegenthart, J.F.G.**, 1982, Sialic Acids—Chemistry, Metabolism and Function, *Springer Verlag Wien*, New York, 1–3pp.
- Schauer, R., Shucla, A.K., Schröder, C. and Muller, E.**, 1984, The anti recognition function of sialic acids: studies with erythrocytes and macrophages, *Pure Appl. Chem.*, 56:907-921pp.
- Schauer, R.**, 1985, Sialic acids and their roles as biological masks, *Trends Biochem. Sci.*, 10:357-360pp.
- Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P. and Shaw, L.**, 1995, Chemistry and biology of sialic acids. In: Rosenberg, A. (Ed.), *Biology of the Sialic Acids*, *Plenum Press*, New York, 7–67pp.
- Schauer, R. and Kamerling, J.P.**, 1997, Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. In: *Glycoproteins II*, Eds: Montreuil J., Vliegenthart J.F.G. and Schachter H., *Elsevier*, Amsterdam, 243-402pp.
- Schauer, R., Malykh, Y.N., Krisch, B., Gollub, M. and Shaw, L.**, 1999, Biosynthesis and biology of N-glycolylneuraminic acid, In *Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation*, edited by Inoue Y, Lee YC, Troy FA II, *Gakushin Publishing Co.*, Osaka, 17-27pp.
- Schauer, R.**, 2000a, Achievements and challenges in sialic acid research, *Glycoconjugate Journal*, 17:485-499pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schauer, R.**, 2000b, Biochemistry of sialic acid diversity, *In Carbohydrates in Chemistry and Biology*, 3:227-243pp.
- Schauer, R., Schmid, H., Pommerencke, J., Iwersen, M. and Kohla, G.**, 2001, Metabolism and role of O-acetylated sialic acids, *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, 491:325–342pp.
- Schenkman, S., Jiang, M.S., Hart, G.W. and Nussenzweig, V.**, 1991, A novel cell surface-trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells, *Cell*, 65:1117–1125pp.
- Schultz, M.J., Swindall, A.F. and Bellis, S.L.**, 2012, Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans, *Cancer Metastasis Rev.*, 31:501-518pp.
- Schwientek, T., Bennett, E.P., Flores, C., Thacker, J., Hollmann, M., Reis, C.A., Behrens, J., Mandel, U., Keck, B. and Schafer, M.A.**, 2002, Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals, *J. Biol. Chem.*, 277:22623–22638pp.
- Seki, T. and Arai, Y.**, 1993, Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system, *Neurosci. Res.*, 17:265–290pp.
- Seki, T. and Rutishauser, U.**, 1998, Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus, *J. Neurosci.*, 18:3757–3766pp.
- Selleck, S.B.**, 2000, Proteoglycans and pattern formation: Sugar biochemistry meets developmental genetics, *Trends Genet.*, 16:206-212pp.
- Selva, E.M., Hong, K., Baeg, G.H., Beverley, S.M., Turco, S.J., Perrimon, N. and Hacker, U.**, 2001, Dual role of the fringe connection gene in both heparan sulphate and fringe-dependent signalling events, *Nat. Cell Biol.*, 3:809-815pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Seveno, M., Bardor, M., Paccalet, T., Gomord, V., Lerouge, P. and Faye, L.,** 2004, Glycoprotein sialylation in plants?, *Nat Biotechnol*, 22:5-6pp.
- Shah, M.M., Fujiyama, K., Flynn, C.R. and Joshi, L.,** 2003, Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells, *Nature Biotechnol.*, 21:1470–1471pp.
- Shanavas, A., Arif, A., Murthy, C.R.K. and Dutta-Gupta, A.,** 2004, Developmental and hormonal regulation of actin and tubulin in the central nervous system of silkworm, *Bombyx mori* during postembryonic development, *Current Science*, 87:383-388pp.
- Sheikh, K.A., Sun, J., Liu, Y.J., Kawai, H., Crawford, T.O., Proia, R.L., Griffin, J.W. and Schnaar, R.L.,** 1999, Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:7532–7537pp.
- Shi, S. and Stanley, P.,** 2003, Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:5234–5239pp.
- Siebert, H.C., von der Lieth, C.W., Dong, X., Reuter, G., Schauer, R., Gabius, H.J. and Vliegenthart, J.F.G.,** 1996, Molecular dynamics-derived conformation and intramolecular interaction analysis of the N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid-containing GD1a and NMR based analysis of its binding to a human polyclonal immunoglobulin G fraction with selectivity for O-acetylated sialic acids, *Glycobiology*, 6:561-572pp.
- Sierra, C., Guevara, J., Lascurain, R., Perez, A., Agundis, C., Zenteno, E. and Vazquez, L.,** 2001, Sialylation is modulated through maturation in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii*, *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 130:179–189pp.
- Springer, T. A.,** 1994, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell*, 76:301–314pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Staudacher, E. and Marz, L.**, 1998, Strict order of (Fuc to Asn-linked GlcNAc) fucosyltransferases forming core-difucosylated structures, *Glycoconj. J.*, 15:355–360pp.
- Stickens, D., Zak, B.M., Rougier, N., Esko, J.D. and Werb, Z.**, 2005, Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses, *Development*, 132:5055–5068pp.
- Takei, Y., Ozawa, Y., Sato, M., Watanabe, A. and Tabata, T.**, 2003, Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans, *Development*, 131:73–82pp.
- Takemae, H., Ueda, R., Okubo, R., Nakato, H., Izumi, S., Saigo, K. and Nishihara, S.**, 2003, Proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta 1,4-galactosyltransferase I is essential for viability in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, 278:15571–15578pp.
- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A. and Muchmore, E.**, 2003, Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:12045–12050pp.
- Ten Hagen, K.G. and Tran, D.T.**, 2002, A UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase is essential for viability in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, 277:22616–22622.
- Ten Hagen, K.G., Tran, D.T., Gerken, T.A., Stein, D.S. and Zhang, Z.**, 2003, Functional characterization and expression analysis of members of the UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase family from *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, 278:35039–35048pp.
- Ten Hagen, K.G., Zhang, L., Tian, E. and Zhang, Y.**, 2009, Glycobiology on the fly: Developmental and mechanistic insights from *Drosophila*, *Glycobiology*, 19, 2:102–111pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Theodosius, D.T., Rougon, G. and Poulain, D. A.,** 1991, Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamoneurohypophysial system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:5494–5498pp.
- Theopold, U., Dorian, C. and Schmidt, O.,** 2001, Changes in glycosylation during *Drosophila* development. The influence of ecdysone on hemomucin isoforms, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(2):189-197pp.
- Thompson, S., Dargan, E. and Turner, G.A.,** 1992, Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer, *Cancer Lett.*, 66:43–48pp.
- Tian, E. and Ten Hagen, K.G.,** 2006, Expression of the UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase family is spatially and temporally regulated during *Drosophila* development, *Glycobiology*, 16:83–95pp.
- Tian, E. and Ten Hagen, K.G.,** 2007a, *O*-linked glycan expression during *Drosophila* development, *Glycobiology*, 17:820–827pp.
- Tian, E. and Ten Hagen, K.G.,** 2007b, A UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase is required for epithelial tube formation, *J. Biol. Chem.*, 282:606–614pp.
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D.L., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U. and Magnuson, T.,** 1993, Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system, *Neuron*, 11:1163–1174pp.
- Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Fox, B. and Selleck, S.B.,** 2000, Structural analysis of glycosaminoglycans in animals bearing mutations in sugarless, sulfateless, and tout-velu. *Drosophila* homologues of vertebrate genes encoding glycosaminoglycan biosynthetic enzymes, *J. Biol. Chem.*, 275:21856-21861pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Trapp, B.D.**, 1990, Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 605:29–43pp.
- Tremblay, L.O. and Herscovics, A.**, 2000, Characterization of a cDNA encoding a novel human Golgi α 1,2-mannosidase (IC) involved in N-glycan biosynthesis, *J. Biol.Chem.*, 275:31655–31660pp.
- Tsuji, S.**, 1996, Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases, *J. Biochem.*, 120:1-13pp.
- Tsujimura, H.**, 1983, Anatomical changes of central nervous system during metamorphosis in *Pieris rapae crucivora* Bouisduval (Lepidoptera: Pieridae), *International Journal of Insect Morphology and Embriology*, 12:119-127pp
- Ueyama, M., Takemae, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Toyoda, H., Ueda, R. and Nishihara, S.**, 2008, Functional analysis of proteoglycan galactosyltransferase II RNA interference mutant flies, *J. Biol. Chem.*, 283:6076-6084pp.
- Uryu, K., Butler, A.K. and Chesselet, M.F.**, 1999, Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum, *J. Comp. Neurol.*, 405:216–232pp.
- Vallejo V., Reyes-Leyva J., Hernandez J., Ramirez H., Delannoy P. and Zenteno E.**, 2000, Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 126:415-424pp.
- van Die, I., van Tetering, A., Bakker, H., van den Eijnden, D.H. and Joziase, D.H.**, 1996, Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a β 1→4-N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains, *Glycobiology*, 6:157–164pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vanhooren, V., Desmyter, L., Liu, X.E., Cardelli, M., Franceschi, C., Federico, A., Libert, C., Laroy, W., Dewaele, S., Contreras, R. and Chen, C.,** 2007, N-glycomic changes in serum proteins during human aging, *Rejuvenation Res.*, 4:521-531pp.
- Vanhooren, V., Laroy, W., Libert, C. and Chen, C.,** 2008, N-glycan profiling in the study of human aging, *Biogerontology*, 9:351-356pp.
- Vanhooren, V., Dewaele, S., Libert, C., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Toussaint, O., Debacq-Chainiaux, F., Poulain, M., Glupczynski, Y., Franceschi, C., Jaspers, K., van der Pluijm, I., Hoeijmakers, J. and Chen, C.C.,** 2010, Serum N-glycan profile shift during human ageing, *Exp. Gerontol.*, 45:738-743pp.
- Varki, A.,** 1992, Diversity in the sialic acids, *Glycobiology*, 2:25–40pp.
- Varki, A.,** 1997, Sialic acids as ligands in recognition phenomena, *The FASEB J.*, 11:248-255pp.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H, Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W. and Etzler, M.E.,** 2009, Essentials of Glycobiology, 2nd edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 784p.
- Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V.N. and Castellino, F.J.,** 1993, The presence of UDP-*N*-acetylglucosamine:α-3-D-mannoside β1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-SF-21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection, *J. Biol. Chem.*, 268:17902–17907pp.
- Vestweber, D. and Blanks, J. E.,** 1999, Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands, *Physiol. Rev.*, 79:181–213pp.
- Vimr, E. and Lichtensteiger, C.,** 2002, To sialylate, or not to sialylate: that is the question, *Trends Microbiol*, 10:254–257pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Viswanathan, K. and Betenbaugh, M.J.,** 2005, Glycosylation in Native and Engineered Insect Cells, Handbook of Carbohydrate Engineering, CRC Press, 431-478pp.
- Vyas, A.A., Patel, H.V., Fromholt, S.E., Heffer-Laue, M., Vyas, K.A., Dang, J.Y., Schachner, M. and Schnaar, R.L.,** 2002, Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:8412–8417pp.
- Wang, J.W., Ambros, R.A., Weber, P.B. and Rosano, T.G.,** 1995, Fucosyltransferase and alpha-L-fucosidase activities and fucose levels in normal and malignant endometrial tissue, *Cancer Res.*, 55:3654–3658pp.
- Wang, Y., Shao, L., Shi, S.L., Harris, R.J., Spellman, M.W., Stanley, P. and Haltiwanger, R.S.,** 2001, Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase, *J. Biol. Chem.*, 276:40338–40345pp.
- Wells, L., Vosseller, K. and Hart, G.W.,** 2001, Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc, *Science*, 291:2376–2378pp.
- Welzl, H. and Stork, O.,** 2003, Cell adhesion molecules: key players in memory consolidation?, *News Physio. Sci.*, 18:147–150pp.
- Wilson, I.B., Harthill, J.E., Mullin, N.P., Ashford, D.A. and Altmann, F.,** 1998, Core α 1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts, *Glycobiology*, 8:651–661pp.
- Wilson, I.B., Zeleny, R., Kolarich, D., Staudacher, E., Stroop, C.J., Kamerling, J.P. and Altmann, F.,** 2001, Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core α 1,3-linked fucose and xylose substitutions, *Glycobiology*, 11:261–274pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wilson, I.B.**, 2002, Functional characterization of *Drosophila melanogaster* peptide *O*-xylosyltransferase, the key enzyme for proteoglycan chain initiation and member of the core 2/I *N*-acetylglucosaminyltransferase family, *J. Biol. Chem.*, 277:21207-21212pp.
- Wood, G.K., Liang, J.J., Flores, G., Sultan, A., Quirion, R. and Srivastava, L.K.**, 1997, Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain, *Mol. Brain Res.*, 51:69–81pp.
- Wujek, P., Kida, E., Walus, M., Wisniewski, K.E. and Golabek, A.A.**, 2004, N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I, *J. Biol. Chem.*, 279:12827–12839pp.
- Xu, D., Song, D., Pedersen, L.C. and Liu, J.**, 2007, Mutational study of heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase and chondroitin sulfate 2-*O*-sulfotransferase, *J. Biol. Chem.*, 282:8356-8367pp.
- Yakubenia, S. and Wild, M.K.**, 2006, Leukocyte adhesion deficiency II. Advances and open questions, *FEBS J.*, 273:4390–4398pp.
- Yamaguchi, H.**, 2002, Chaperone-Like Functions of *N*-Glycans in the Formation and Stabilization of Protein Conformation, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 14:139–151pp.
- Yang, L.J.S., Zeller, C.B., Shaper, N.L., Kiso, M., Hasegawa, A., Shapiro, R. E. and Schnaar, R.L.**, 1996, Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:814–818pp.
- Yang, P.F., Yin, X.H. and Rutishauser, U.**, 1992, Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM, *J. Cell Biol.*, 116:1487–1496pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yazawa, S., Nakamura, J., Asao, T., Nagamachi, Y., Sagi, M., Matta, K.L., Tachikawa, T. and Akamatsu, M.,** 1993, Aberrant alpha 1-->2 fucosyltransferases found in human colorectal carcinoma involved in the accumulation of Leb and Y antigens in colorectal tumors, *Jpn. J. Cancer Res.*, 84:989–995pp.
- Zanetta, J.P., Pons, A., Iwersen, M., Mariller, C., Leroy, Y., Timmerman, P. and Schauer, R.,** 2001, Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives, *Glycobiology*, 11:663–676pp.
- Zhang, L., Xu, J., Zhang, L., Zhang, W. and Zhang, Y.,** 2003, Determination of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeled carbohydrates by liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 793(1):159-165pp.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad: Seçkin SOYA

Doğum tarihi : 22.09.1983 **Doğum yeri :** MANİSA **Cinsiyet :** Erkek

ÖĞRENİM

- **Lise :** Fatih Anadolu Lisesi - MANİSA (1994-2001)
- **Üniversite Lisans :** Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü (2001-2006)
- **Yüksek Lisans :** Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik
Anabilim Dalı (2007-2008)
- **Doktora :** Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(2009-2013)

AKADEMİK DURUM

- Öğretim Görevlisi, (Başlangıç: Kasım 2008), Ege Üniversitesi Ege Meslek
Yüksekokulu.
- Araştırma Görevlisi, (Başlangıç: Kasım 2008), Ege Üniversitesi Fen
Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji AD.

KATILDIĞI KONGRE VE KURSLAR

- Biyoenerji Sempozyumu / Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama
ve Araştırma Merkezi (2004)
- Basic Principles Of Cell Culture Technology and Artificial Organs (2004)
- Biotechnology Applications In Nutriment in Ege University Science and
Technology Research Center (2005)
- Akademik İngilizce Dil Kursu (2003-2006), İzmir
- İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu (2005)
- Adli Bilimlerde Güncel Gelişmeler / Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji
Uygulama ve Araştırma Merkezi (2005)
- Türk Amerikan Derneği TOEFL kursu – 2008
- IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi – Ekim 2008
- 3. Ulusal HPLC ve Mass Spektrometri Çalıştay ve Sempozyumu – GATA
– Mayıs 2008
- 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Trabzon, 22-25 Haziran 2009

- “Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Kursu” katılım ve hayvan kullanım sertifikası, Ege Üniversitesi İzmir, 04-15 Ocak 2010
- “Onkolojide Bioinformatik ve Biyonanoteknolojik Yöntemler Kursu “ katılımı 5-6 Mayıs 2010, Ege Üniversitesi İzmir
- “Multidisciplinary Approaches in Cell Death Research” katılımı, 28-31 Mayıs 2010, Cell Death Society
- “V.International Bioengineering Congress” katılımı, 16-19 Haziran 2010, Ege Üniversitesi İzmir
- “Uluslararası Katılımlı Proteomik Çalıştayı, Proteomistanbul” katılım, 12-17 Temmuz 2010, İstanbul Üniversitesi,
- “Sialoglyco2010“ katılımı, 21-26 Ağustos 2010, Potsdam, Almanya
- “Kanser Biyolojisi ve İmmunolojisi Kursu” 29-30 Mart 2012, Özdere, İzmir
- 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, Bornova, İzmir
- II.Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, 11-14 Haziran 2013, Çeşme, İzmir
- Glikobiyoloji’de Optik ve Analitik Yöntemler Çalıştayı, 10 Haziran 2013, Çeşme, İzmir

YAYINLADIĞI KİTAP, MAKALE VE POSTERLER

-KİTAP BÖLÜMÜ

- Hilal Betül KAYA, **Seçkin SOYA**, Cengiz AKKALE, Bahattin TANYOLAÇ, Moleküler Biyoloji, 2.Baskı, Nobel Yayınevi, Editörler; Ahmet Yıldırım-Fevzi Bardakcı- Mehmet Karataş- Bahattin Tanyolaç, Biyoteknoloji ve Biyoinformatik (16.Bölüm), 2010

-MAKALE

- Levent ŞİK, Feyza CANDAN, **Seçkin SOYA**, Canan KARAMENDERES, Teoman KESERCIOĞLU, Bahattin TANYOLAÇ, Genetic variation among *Crocus L.* species from Western Turkey as revealed by RAPD and ISSR markers, Journal of Applied Biological Sciences 2 (2): 73-78, 2008, ISSN: 1307-1130.
- **Seçkin SOYA** , Bahattin TANYOLAÇ, Screening of the Tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Lines for the Resistance to Root-Knot Nematodes and *Verticillium* wilt by DNA Markers” Journal of Applied Biological Sciences, 4 (2): 39-44, 2010.

-SÖZLÜ SUNUM

- **Seçkin SOYA**, Umut ŞAHAR, M.Salih YIKILMAZ, Sabire KARAÇALI, “İpek Böceği (*Bombyx mori* L.)’nin Gelişen Sinir Sistemindeki Monosakkarit Değişimlerinin CapLC-ESI-MS/MS’le Belirlenmesi”, II.Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, 11-14 Haziran 2013, Çeşme, İzmir

-POSTER

- **Seçkin SOYA**, Savaş İZZETOGLU, Remziye DEVECİ, Sabire KARAÇALI, Bitkilerde Sialik Asitlerin Belirlenmesi, 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Trabzon, 22-25 Haziran 2009,
- **Seçkin SOYA**, Bahattin TANYOLAÇ, Screening of the Tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Lines for the Resistance to Root-Knot Nematodes and *Verticillium* wilt by DNA Markers, Bioengineering Congress 2010 (BEC2010) , 16-19 Haziran 2010, İzmir
- Sabire KARAÇALI, Remziye DEVECİ, Savaş İZZETOGLU, M.Salih YIKILMAZ, Umut ŞAHAR, Önder DEVECİ, **Seçkin SOYA**, Determination of Sialic Acids in Prothoracic Glands and Hemolymph of *Galleria mellonella* During Aging Process, Sialoglyco2010, 21-26 Ağustos 2010, Potsdam, Almanya
- **Seçkin SOYA**, Umut ŞAHAR, Sabire KARAÇALI, İpek Böceği (*Bombyx mori* L.) İp Merdiven Sinir Sisteminde Gelişmeye Bağlı Sialik Asit Değişikliklerinin Belirlenmesi, 21.Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir
- **Seçkin SOYA**, M.Salih YIKILMAZ, Remziye DEVECİ, Sabire KARAÇALI, İpek Böceği (*Bombyx mori* L.) Beyninde Sialik Asit, GalNAc ve GlcNAc Değişikliklerinin Yaşlanma Sürecinde Fluoresan Mikroskopla Belirlenmesi, II.Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, 11-14 Haziran 2013, Çeşme, İzmir