

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**DENİZKESTANESİ *PARACENTROTUS LIVIDUS*'UN
YUMURTA JEL KILIFI GLİKOPROTEİNLERİNİN
İZOLASYONU VE GLİKAN PROFİLİNİN
MALDI-TOF-MS ve LC-MS/MS SİSTEMİNDE
GLİKOMİK YAKLAŞIMLA BELİRLENMESİ**

Umut ŞAHAR

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Remziye DEVECİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi : 11.02.2015

Bornova-İZMİR


2015

Umut ŞAHAR tarafından doktora tezi olarak sunulan “**DENİZKESTANESİ PARACENTROTUS LIVIDUS’UN YUMURTA JEL KILIFI GLİKOPROTEİNLERİNİN İZOLASYONU VE GLİKAN PROFİLİNİN MALDI-TOF-MS VE LC-MS/MS SİSTEMİNDE GLİKOMİK YAKLAŞIMLA 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 11.02.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Remziye DEVECİ

.....


Raportör Üye : Yrd. Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU

.....


Üye : Doç. Dr. Erdal BALCAN

.....


Üye : Doç. Dr. Beyhan GÜRCÜ

.....


Üye : Yrd. Doç. Dr. Süleyman KOÇAK

.....


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Denizkeşanesi *Paracentrotus Lividus*'un Yumurta Jel Kılıfı Glikoproteinlerinin İzolasyonu ve Glikan Profilinin MALDI-TOF-MS ve LC-MS/MS Sisteminde Glikomik Yaklaşımla Belirlenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

11 / 02 / 2015

Umut ŞAHAR

ÖZET**DENİZKESTANESİ *PARACENTROTUS LIVIDUS*'UN
YUMURTA JEL KILIFI GLİKOPROTEİNLERİNİN İZOLASYONU
VE GLİKAN PROFİLİNİN MALDI-TOF-MS ve LC-MS/MS
SİSTEMİNDE GLİKOMİK YAKLAŞIMLA BELİRLENMESİ**

ŞAHAR, Umut

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Remziye DEVECİ

Şubat 2015, 125 sayfa

Sperm ve yumurta interaksiyonunda yüzey karbonhidrat içerikleri büyük önem taşımaktadır. Denizkestanesi yumurtasını saran jel tabakada karbohidratça zengin glikoproteinler bulunmaktadır. Henüz çalışmamış olmakla birlikte bunların, omurgalı tanıma molekülleri ile homolog olduğu düşünülmektedir. Bu tabakada yer alan bazı glikoproteinler karakterize edilmiş olmasına karşın, glikan profilleri belirlenmemiştir. Bu nedenle bu tez çalışmasında; memeliler gibi alesital tip yumurtaya sahip olması nedeniyle model organizma olarak seçilen denizkestanesi *Paracentrotus lividus*'un yumurta jel kılıfında, fertilizasyonda önemi bilinen çeşitli glikoproteinlerin belirlenerek, glikan profillerinin glikomik yaklaşımla aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bunun için, asidik yöntemle izole edilen yumurta jel kılıflarına diyaliz ve liyofilizasyon yapılmış ve protein miktarı Bradford yöntemiyle ölçülmüştür. Jel kılıfın proteinleri SDS-PAGE ile, bunların hangilerinin glikozilli oldukları Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama ile, glikozilli bu proteinlerden glikoprotein olanlarını belirlemek için ise, glikoproteinlerde uç şeker olan sialik aside spesifik LFA ile lektin blotlama yapılmıştır. Glikoproteinlerin glikan zincirlerini oluşturan monosakkaritlerin analizi için yumurta jel kılıfına asit hidrolizi yapılmıştır. Türevlendirme için sialik asit dışındaki monosakkaritlerde PMP reaktifi, sialik asitte DMB flouresan reaktifi kullanılmıştır. Örnekler CapLC-ESI-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir. Glikanların glikomik yaklaşımla belirlenmesi için; N-glikanlar protein zincirinden PNGase F ile koparılmış, permetilasyon ile

türevlendirilmiş, MALDI-TOF-MS ile N₂ lazer eşliğinde analizleri yapılmıştır. Aynı örnekler, CapLC-ESI-MS/MS sisteminde parçalanma iyonları ile karakterize edilmiştir. O-glikan analizi için yumurta jel kılıfına amonyak çözeltisi doğrudan ilave edilmiştir. Ardından PMP ile türevlendirilmiş ve LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir.

Jel kılıf protein/glikoprotein profilinin karakterizasyonu sonucunda; SDS-PAGE ile ~250, 55, 50 ve 15 kDa civarında dört protein bandı ayırt edilmiştir. PAS boyama ile 250, 35 ve 10 kDa civarındaki proteinlerin glikozilli oldukları, bunlardan da sadece 250 kDa civarındaki büyük proteinin glikoprotein olduğu anlaşılmıştır. 35 ve 10 kDa civarındakiler olasılıkla proteoglikandır. Jel kılıf glikoproteinlerinde monosakkarit analizi sonucunda; sırasıyla en fazla fukoz olmak üzere mannoz, arabinoz+ksiloz, galaktoz, glukoz, N-asetilgalaktozamin ve N-asetilglukozamin bulunmuştur. Riboz, genetik materyalden kaynaklanmaktadır. Sialik asit tiplerinden en fazla Neu5Gc bulunmuştur. Ardından sırasıyla Neu5Ac, Neu9Ac5Gc, Neu5,9Ac₂, Neu8Ac5Gc, Neu7Ac5Gc, Neu5,7Ac₂, Neu5,8Ac₂ gelmektedir. Eser düzeyde de sülfat grubu taşıyan Neu5GcS ve Neu5AcS belirlenmiştir. Jel kılıf glikoproteinlerinde glikomik yaklaşımla yüksek mannoz N-glikan ve O-heksoz tipinde O-glikanlar bulunmuştur. Ayrıca çekirdek 1-8 yapıya benzer O-glikanlar da LC-MSⁿ sisteminde belirlenmiştir. MALDI-TOF sisteminde de çekirdek 1-8 yapısı bulunabilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada, yeni ve modern glikomik tekniklerden olan MALDI-TOF/MS, LC-ESI-MS/MS, lektin blotting sistemleri yanında bilgisayar programları da kullanılarak *P.lividus* yumurta jel kılıfı glikan profili ilk defa ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada model organizma olarak kullanılan *P.lividus*'un evrim sürecinde diğer türlere göre değişmeksizin günümüze kadar yaşamını sürdürmesi, bu türün özel yapısını ortaya koymaktadır. Bu sayede sadece fertilizasyon değil, onun da ötesinde türleşmenin de moleküler açıklamalarına özellikle glikobiyolojik açıdan cevapların bulunabilmesi ilgi çekicidir. Model organizmada belirlenen detaylar anlaşıldıktan sonra diğer canlılarda da homolog moleküllere bakış açısı etkilenebilir. Bu bağlantıların iyi bilinmesi insanlarda infertilitenin araştırılmasına ve çözülmesine de katkı sağlayabilir

Anahtar sözcükler: Monosakkaritler, Glikomiks, MALDI-TOF-MS, LC-MS/MS, Lektin Blotlama, N-glikan, O-glikan, Denizkestanesi *Paracentrotus lividus*

ABSTRACT**ISOLATION OF EGG JELLY COAT GLYCOPROTEINS OF SEA URCHIN *PARACENTRATUS LIVIDUS* AND IDENTIFICATION OF GLYCAN PROFILE BY MALDI-TOF-MS AND LC-MS/MS SYSTEM USING THE GLYCOMICS APPROACH**

ŞAHAR, Umut

Ph. D. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Remziye DEVECİ

February 2015, 125 pages

The surface carbohydrate content is crucial in the sperm and egg interactions. There are carbohydrate-rich glycoproteins in the jelly coat which surrounding sea urchin eggs. Although there are no studies yet they are considered to be homologous to the vertebrate recognition molecules. Although some glycoproteins involved in this layer have been characterized, glycan profiles are not determined. Therefore, in this thesis, it is aimed to identify various glycoproteins known importance in fertilization and to clarify the glycan profile by glycomics approach in the egg jelly coat of the sea urchin *Paracentrotus lividus* which is selected as a model organisms due to having alecithal type egg like mammals.

Hence, isolated egg jelly coat by acidic method was lyophilized and dialysed and protein content was measured by the Bradford method. Jelly coat proteins determined by SDS-PAGE, glycosylation of proteins identified by periodic acid-Schiff (PAS) staining, glycoproteins were defined by lectin blotting using LFA which is specific for the terminal sugar in the glycoprotein called sialic acid. Analysis of monosaccharides that is forming the glycan chains of glycoproteins is performed using acid hydrolysis to the egg jelly coat. PMP was used for the derivatization of the monosaccharides except sialic acids, DMB fluorescent reagent used for the sialic acids. Samples were analysed using CapLC-ESI-MS/MS system. To determine glycans with glycomics approach; N-glycans were released by PNGase F from protein chain, derivatized with permethylation and analysis were performed by MALDI-TOF-MS in the presence

of N₂ with laser. The same samples were characterized using CapLC-ESI-MS/MS system with fragment ions. Ammonia solution was directly added on to the egg jelly coat for O-glycan analysis. Then derivatized with PMP and analysed by LC-MS/MS system.

After the characterisation of protein/glycoprotein of egg jelly; by SDS-PAGE four protein band were observed near 250, 55, 50 ve 15 kDa. It is understood using PAS staining that near 250, 35 ve 10 kDa proteins are glycosylated, those of only near 250 kDa protein is a large glycoprotein. Probably near 35 and 10 kDa bands are proteoglycans. As a result of the monosaccharide analysis of jelly coat glycoproteins; fucose was found at high level and the mannose, arabinose+xylose, galactose, glucose, N-acetylgalactosamine ve N-acetylglucosamine found respectively. Ribose is derived from genetic material. Neu5Gc was found in highest level among sialic acid types. Then Neu5Ac, Neu9Ac5Gc, Neu5,9Ac₂, Neu8Ac5Gc, Neu7Ac5Gc, Neu5,7Ac₂, Neu5,8Ac₂ was found respectively. Neu5GcS and Neu5AcS which substituted with sulphate were determined in trace level. High mannose N-glycan and O-hexose type O-Glycans were determined in the egg jelly coat glycoproteins using glycomics approach. Furthermore, core 1-8 like O-glycans were identified using LC-MSⁿ system. Core 1-8 O-glycans determined in MALDI-TOF-MS, too.

In conclusion; in this thesis, glycan profile of the egg jelly of *P. lividus* revealed for the first time using MALDI-TOF/MS, LC-ESI-MS/MS, lectin blotting and also software which are new and modern glycomics techniques. *P. lividus* is used as a model organism in this study which survives until today and has been unchanged during the evolution process compared to the other species, reveals the special nature of this species. Therefore, not only fertilization, but also it is interesting to get answers of the molecular explanation of speciation especially from glycobiological view. After the details identified in the model organism is understood, the perspective to the homologous molecules could be affected by other species. It may also contribute to the investigation and deciphering of infertility in humans by knowing these relations well.

Keywords: Monosaccharides, Glycomics, MALDI-TOF-MS, LC-MS/MS, Lectin Blotting, N-glycan, O-glycan, Sea urchin *Paracentrotus lividus*

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımnda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam ve danışmanım Sayın Doç. Dr. Remziye DEVECİ'ye, bu alanda çalışma fırsatını sağlayan ve beni motive eden saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sabire KARAÇALI'ya, bilgi, deneyim ve yardımseverliğiyle beni destekleyen Sayın Prof. Dr. Ten Feizi'ye, tez ve laboratuvar çalışmalarımnda deneyimleriyle bana yardımcı olan değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Seçkin Soya'ya ve Dr. Hüseyin Can'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Savaş İzzetoğlu, Dr. M.Salih Yıkılmaz ve Hüseyin Özaydın'a bana yardımcı ve destek oldukları için ve ayrıca sabır ve hoşgörü ile bizlere destek olan Sayın Cahit Çökelez'e çok teşekkür ederim.

Daima yanımda olan, mesleki bilgisiyle ufkumu açan, destekçim, sevgili eşim Esra ATALAY ŞAHAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzakta olsalar da her zaman yanımda hissettiğim sevgili Babam, Annem ve Ablalarım, çok değerli aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Umut ŞAHAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACTix
TEŞEKKÜRxi
ŞEKİLLER DİZİNİxvi
ÇİZELGELER DİZİNİxx
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİxxii
1. GİRİŞ1
2. LİTERATÜR ÖZETİ3
2.1 Glikanların Yapısı3
2.2 Glikozilasyon Tipleri ve Glikan Biyosentezi4
2.3 Glikanların Biyolojik Rollerini.....	.7
2.4 Glikanların Yapısal Analizinde Analitik Yaklaşımlar ve Glikomiks8
2.4.1 Sıvı kromatografi (HPLC)8
2.4.2 Kütle spektrometresi (MS)9
2.4.3 MALDI-TOF-MS ve LC- ESI-Ion Trap MS ile glikan analizi	13
2.5 Döllenmede Glikanların Rolü.....	15
2.6 Yumurta Jel Kılıfında Glikanlar	16

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1 Çalışma materyali	22
3.2 Yöntemler.....	23
3.2.1 Örnek Hazırlama.....	23
3.2.2 Jel kılıf protein/glikoprotein profilinin SDS–PAGE ve lektin blot ile belirlenmesi	25
3.2.3 Jel kılıf glikoproteinlerinde monosakkaritlerin belirlenmesi.....	27
3.2.4 N- ve O- glikanların glikomik yaklaşımla belirlenmesi.....	31
4 BULGULAR.....	37
4.1 Jel Kılıf Protein/Glikoprotein Profilinin SDS–PAGE ve Lektin Blotlama ile Karakterizasyonu.....	37
4.2 Jel Kılıf Glikoproteinlerinde Monosakkaritler.....	39
4.3 Jel Kılıf Glikoproteinlerinde Glikomik Yaklaşımla Belirlenen N- ve O- Glikanlar.....	50
4.3.1 Jel kılıf glikoproteinlerinde glikomik yaklaşımla belirlenen N-Glikanlar...	52
4.3.2 Jel kılıf glikoproteinlerinde glikomik yaklaşımla belirlenen O-Glikanlar...	63
4.4 Bulgulara İlişkin Temel Sonuçlar	71
5.TARTIŞMA	72

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Glukoz molekülünün açık zincir ve halkalı yapısı.....	3
2.2. Glukoz molekülünün açık zincir yapısı halkalı yapıya döndüğünde α - ve β - anomerleri meydana gelir	4
2.3. N- ve O-glikanlar ile GAG sembolik biçimleri	6
2.4. Oligosakkaritlerin biyolojik rolleri	7
2.5. ESI şematik görünümü.....	10
2.6. MALDI şematik gösterimi.....	11
2.7. MALDI-TOF şematik görünümü.....	11
2.8. Ion Trap şematik gösterimi ve Bruker Ion Trap ticari yapısı.	12
2.9. Permetillenmiş glikanların sodyum ekli iyonlarının glikozidik bağ kırılması ile oluşan parçalanma iyonları	14
2.10. O-glikan çekirdek yapıları	15
2.11. Moleküler saat çalışması sonrası elde edilen tür benzerlikleri	20
3.1. Denizkestanesi <i>Paracentratus lividus</i>	22
3.2. Ergin denizkestanelerinin toplandığı kıyı şeridi, Foça, İzmir.....	22
3.3. Yumurtaların elde edilmesi.....	23
3.4. Yumurtayı dıştan saran jel kılıfın stereo mikroskop ile görüntüsü.....	24

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.5. Kaset diyaliz sistemi.....	25
3.6. Monosakkaritlerin (sialik asit hariç) PMP ile türevlenme reaksiyonu. ..	28
3.7. Sialik asidin DMB ile türevlenme reaksiyonu.....	29
3.8. N-Glikan ve O-Glikan analizinde örnek hazırlama prosedürü şematik gösterimi	32
4.1. Yumurta jel kılıfı ile kontrol amaçlı kullanılan BSA ve Fetuinin SDS-PAGE jeldeki protein bantları	37
4.2. Jel kılıfa ait glikozillenmiş protein (glikoprotein ve/veya proteoglikan) bantları ve kontrol amaçlı kullanılan fetuin glikoproteini bandı	38
4.3. TMB ile reaksiyon sonrası görünür olan LFA lektin blotlama	38
4.4. Monosakkarit standartları MRM kromatogram ve spektrumları.....	40
4.5. Yumurta jel kılıfı monosakkaritleri MRM kromatogramları.	41
4.6. Yumurta jel kılıfı tüm monosakkaritlerin dağılımı (Sialik asit hariç). ...	43
4.7. Yumurta jel kılıfı heksoz ve heksozamin dağılımı Monosakkaritlerin dağılımı.....	43
4.8. Sialik asit standartları DMB türevlerinin MRM kromatogram ve spektrumları.....	44
4.9. BSM referans glikoproteini asit hidrolizi ve DMB türevlendirilmesi sonrası CapLC-MS/MS analizi sonucu elde edilen sialik asit kromatogram ve spektrumları.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.10. Yumurta jel kılıfı sialik asit tiplerine ait MRM kromatogramları..	48
4.11. Yumurta jel kılıfı sialik asitleri dağılımı.....	49
4.12. Yumurta jel kılıfı sialik asitleri (Neu5Gc hariç).....	49
4.13. Yumurta jel kılıfında SO ³⁻ grubu taşıyan sialik asitler..	50
4.14. İndirgenmemiş ve permetillenmiş glikan yapılarının şematik gösterimi ve türevlenme reaksiyonu sonrası elde edilen kütle değerleri..	51
4.15. N-glikan çekirdek yapısı.....	52
4.16. Yüksek mannoz tip N-glikan yapısında her ilave heksoz 204 kütle birimi artışına neden olur.....	52
4.17. Yumurta jel kılıfından elde edilen proteinlerin permetillenmiş ve %35 ACN ile elüsyonu yapıp saflaştırılmış N-glikanlarının MALDI-TOF spektrumu.....	53
4.18. Yumurta jel kılıfından elde edilen proteinlerin permetillenmiş ve %50 ACN ile elüsyonu yapıp saflaştırılmış N-glikanlarının MALDI-TOF spektrumu.....	53
4.19. Yumurta jel kılıfından elde edilen proteinlerin permetillenmiş saflaştırılmış O-glikanlarının MALDI-TOF spektrumu...	55
4.20. m/z 903,5 ([1761+2Na] ²⁺) iyonun MS/MS parçalanması sonrası elde edilen spektrum.....	59
4.21. m/z 1005,5 ([1965+2Na] ²⁺) iyonun MS/MS parçalanması sonrası elde edilen spektrum.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.22. m/z 1107,6 ($[1761+2Na]^{2+}$) iyonun MS/MS parçalanması sonrası elde edilen spektrum... ..	61
4.23. m/z 1210 ($[1761+2Na]^{2+}$) iyonun MS/MS parçalanması sonrası elde edilen spektrum.... ..	62
4.24. Fetuin standart proteininin O-glikan analizi sonrası elde edilen yapılardan Sia-Gal-GalNAc yapısına ve parçalanma iyonlarına ait spektrum... ..	63
4.25. Hek ₃ -PMP ₂ : m/z 835 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrum (b).... ..	64
4.26. Glc ₄ -PMP ₂ : m/z 998 iyonu ESI-MS/MS iyonu yapısı ve parçalanma yolağı... ..	65
4.27. Hek ₄ -PMP ₂ : m/z 998 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrumlar (b ve c).....	66
4.28. Hek ₂ -PMP ₂ : m/z 673 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrum (b).... ..	67
4.29. Hek ₂ -HekNAc-PMP ₂ : m/z 898 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrum (b).....	68
4.30. Hek ₃ -HekNAc-PMP ₂ : m/z 1060 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrumlar (b ve c).	69
4.31. Hek-Neu5Gc-PMP ₂ : m/z 860 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrum (b).....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Monosakkaritlerin molekül yapıları ve sembolleri.....	5
3.1. Yapay deniz suyu için kullanılan tuzlar ve miktarları... ..	23
3.2. Monosakkarit analiz gradient tablosu... ..	30
3.3. Sialik asit analiz gradient tablosu... ..	31
3.4. Monosakkarit analizi için kütle spektrometresi değerleri tablosu... ..	31
3.5. O-glikanların analizinde gradient tablosu.....	36
4.1. Monosakkarit alıkonma süreleri, ana iyon ve parçalanma iyonları... ..	39
4.2. Yumurta jel kılıfı Monosakkaritleri MRM analizi ve pik alanları.....	42
4.3. LC-ESI-MS/MS ile analiz edilen BSM referans maddesine ait DMB-sialik asit türevleri karakteristik [M+H] ⁺ iyonları, CID parçalanma iyonları ve alıkonma süreleri... ..	45
4.4. Yumurta jel kılıfı Sialik asitleri MRM analizi ve pik alanları... ..	47
4.5. Kükürt taşıyan Sialik Asit alıkonma süreleri, ana iyon ve parçalanma iyonları.....	50
4.6. Monosakkarit moleküllerinin türevlenmeden önceki özgün mol ağırlıkları ve permetilasyon sonrası kazandığı yeni kütle değerleri... ..	51
4.7. Yumurta Jel Kılıfından izole edilen permetillenmiş N ve O-Glikan fraksiyonlarının özet gösterimi.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.8. Permetilasyon sonucu türevlendirilen ve MALDI-TOF sisteminde tek pozitif yük ile tanımlanan yüksek mannoz tip glikanlar ESI-MSn sisteminde, sistemin doğası gereği, 2+ iyonlaşarak ana iyonu oluşturmuştur.....	56
4.9. CapLC-MS/MS sisteminde Man6GlcNAc2 yapısını ifade eden m/z 903,5 iyonunun parçalanma ürünlerine ilişkin olası yapıları ve parçalanma iyon tipleri.....	57
4.10. Yumurta Jel Kılıfından izole edilen ve PMP ile türevlendirilmiş O-Glikan fraksiyonlarının özet gösterimi.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
mM	Milimolar
g	Gravity
rpm	Revolutions per minute
dk	Dakika
psi	Pounds per Square Inch
L	Litre
nm	Nanometre
kDa	kilodalton
m/z	Kütle/yük
APS	Amonyum persülfat
Ara	Arabinoz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Asn	Asparajin
F	Fetuin
Fuc	Fukoz
GAG	Glikozaminoglikan
Gal	Galaktoz
GalNAc	N-asetilgalaktozamin
Glc	Glukoz
GlcNAc	N-asetilglukozamin
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	High pressure liquid chromatography
KDN	Deaminonöraminik asit
LFA	<i>Limax flavus</i> aglütinin
Man	Mannoz
Neu	Nöraminik asit
Neu5,9Ac2	N-asetil-9-O-asetilnöraminik asit
Neu5Ac	N-asetilnöraminikasit
Neu5Gc	N-glikolilnöraminik asit
PAS	Periodic Acid-Schiff
PMP	1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Serin
Sia	Sialik Asit
Na ₂ O ₄ S ₂	Sodyum hidrosülfid
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifloroasetik asit
Thr	Treonin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
UV	Ultraviole
Xyl	Ksiloz

1. GİRİŞ

Glikobiyoloji, glikozilasyon sonucu oluşan glikanların yapıları, işlevleri ve düzenlenmesi ile ilgili bir bilimsel alandır (Taylor and Drickamer, 2006). 1980 sonrası yeni analitik tekniklerin gelişmesi ile beraber şekerlerin (monosakkarit, oligosakkarit vs) biyolojik rollerini tanımlamak üzere yeni kavramlar ortaya atılmıştır. Bu sayede karbohidratların hücre içi veya hücre dışı rollerinin yeni başlık altında -Glikobiyoloji- incelenmesi hedeflenmiş ve IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature masasında terminoloji kabul edilmiştir (Rademacher et al., 1988).

Yaşayan bütün organizmaların proteinleri genellikle farklı biçimlerde değişikliğe uğrar. En karmaşık ve enerji gereksinimi yüksek protein modifikasyonu glikozilasyondur. Glikoproteinler, çoğunlukla dallanmış oligosakkaritlerin kovalent bağ tipiyle bağlı olduğu proteinlerdir (Lehle et al., 2006). Tarihsel süreçte glikanların sadece hücrel dekorasyon yapıları olduğu algısı ve glikan analiz zorlukları glikomiksin, genomik ve proteomikse göre daha sınırlı gelişmesine sebep olmuştur. Ancak, doğal ve terapötik glikoproteinlerin glikozilasyonunun öneminin anlaşılmasındaki son gelişmeler glikan analizine ilgiyi artırmıştır. Glikokonjugatlar; proteoglikanlar, glikolipitler ve glikoproteinler gibi çeşitli moleküler yapıları kapsar. Bu çeşitlilik ile **glikanlar** diğer biyomoleküllerden çok daha hassas bilgiler taşıyabilirler (Dwek et al., 1996).

Glikanların bu hassas bilgi taşıma özellikleri, hücre yüzeylerinde bir taraftan hücre-hücre, hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimi, sinyal iletimi ve konak-patojen etkileşimi (Crocker and Feizi, 1996; Solis et al., 2001; Kilpatrick, 2002; Gabius, 2004) gibi olayları yönlendirirken, diğer taraftan fertilizasyon (Rosati et al., 2000) ve gelişimde önemli roller oynar (Dennis et al., 1999; Rudd et al., 2001).

Sperm ve yumurta interaksiyonunda yüzey karbonhidrat içerikleri büyük önem taşımaktadır. Memelilerde zona pellucida adı verilen ve oogenezis sırasında oluşan, sülfatlanmış glikoproteinlerden meydana gelen bir ekstrasellüler matriks tabakası bulunmaktadır. Bu tabakadaki 3 glikoproteinin şeker zincirleri, yumurta-

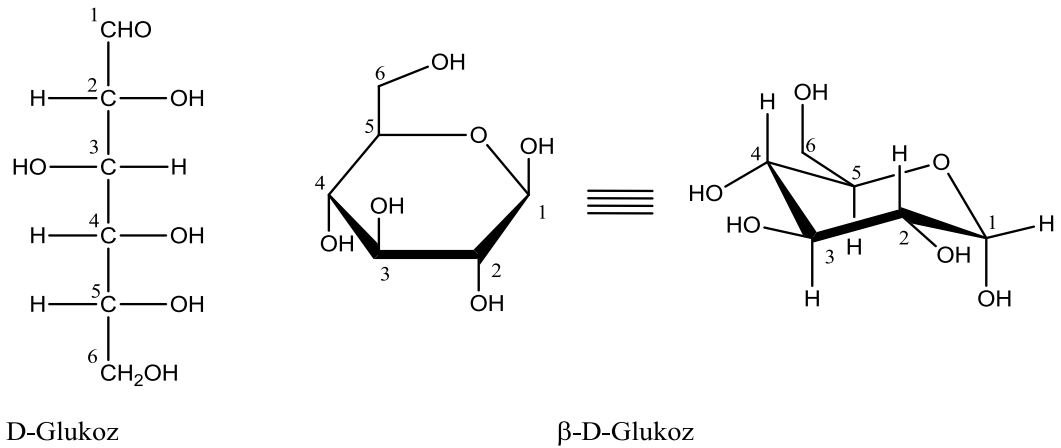
sperm interaksyonunda iş görmektedir. Deniz kestanesi yumurtasını saran jelatin tabakada da karbohidratça zengin glikoproteinler bulunmaktadır (Isaka et al., 1970; SeGall and Lennarz, 1979; Foltz and Lennarz, 1993). Sözkonusu denizkestanesi yumurta yüzeyinde bulunan karbohidratça zengin glikoproteinlerin omurgalılarda korunduğu bilinen tanıma moleküllerinin, henüz çalışmamış olmakla birlikte Echinodermata üyesi denizkestanesindeki yumurta yüzey glikoproteinleri ile homolog olduğu düşünülmektedir (Mengerink and Vacquier 2001). Denizkestanesi yumurtasını dıştan saran karbohidratça zengin jelatin kılıfta yer alan bazı glikoproteinlerin karakterize edilmiş olmasına karşın, glikan profillerini belirlemeye yönelik çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu bilgilere dayanarak bu tez projesinin amacı; memeliler gibi alesital tip yumurtaya sahip olması nedeniyle model organizma olarak seçilen denizkestanesi *Paracentrotus lividus*'un yumurta jel kılıfında, fertilizasyonda önemi bilinen çeşitli glikoproteinlerin belirlenerek, glikan profillerinin glikomik yaklaşımla sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ve Matrix-assisted laser desorption/ionization- Time of Flight (MALDI-TOF) sistemi kullanılarak aydınlatılmasıdır.

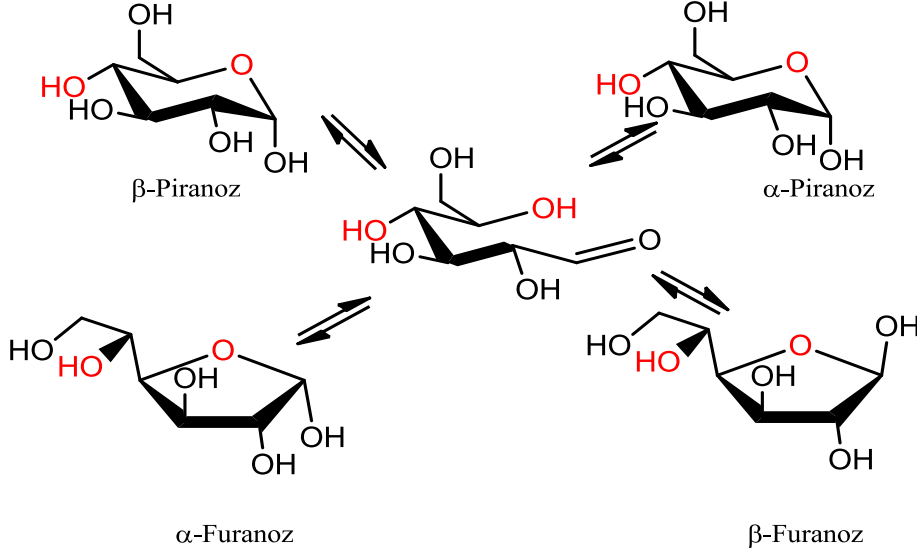
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Glikanların Yapısı

Glikanlar; monosakkaritler, oligosakkaritler, polisakkaritler ile bunların konjuge yapılarını da içeren bütün organizmalarda kritik öneme sahip olan yapıtaşlarıdır. İnsan proteinlerinin yaklaşık yarısı glikoproteindir (Kiessling and Splain, 2010). IUPAC Altın Kitap ise glikanları çok sayıda monosakkaritin glikozidik bağla meydana getirdiği bileşik olarak tanımlamıştır (McNaught and Wilkinson, 1997). Monosakkaritler beş veya altı karbonlu polihidroksi aldehit veya polihidroksi keton yapıda olan ve glikan zincirlerini oluşturan oligosakkaritlerin temel yapıtaşı olan moleküllerdir. Bu tanımın içinde yer alıp dokuz karbonlu olan diğer bir monosakkarit ise sialik asittir. Monosakkaritler açık zincir ve ya halka biçiminde olabilirler (Şekil 2.1). Özel bir karbondaki hidroksil grubun yönelimi o monosakkaritin başka bir kimsiyal özellik kazanmasını sağlar. Örneğin galaktoz bir monosakkarit olup glukozun C-4 epimeridir. Kiral karbondaki hidroksil grubun ekvatoriyal konumu α ve eksen konumu β anomer (Şekil 2.2) olarak adlandırılır (Varki et al., 2009; Marino et al., 2010). Omurgalılarda en çok bulunan monosakkaritler Çizelge 2.1’de halka molekül yapıları ve sembolleri ile gösterilmiştir. Çizelgede belirtilen moleküllerin çoğu D- formunda olup fukoz L- enantiyomerinde bulunmaktadır.



Şekil 2.1: Gluko ζ molekülünün açık zincir ve halkalı yapısı (Varki et al., 2009).



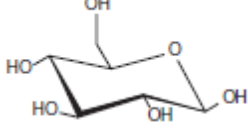

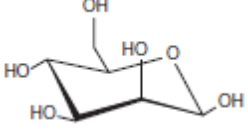

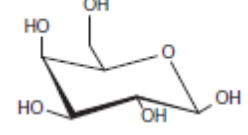

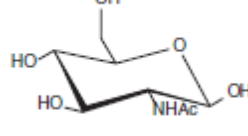

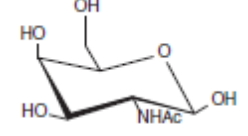

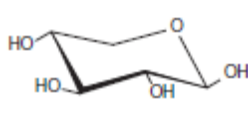

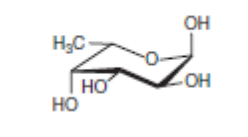

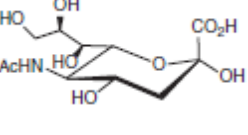

Şekil 2.2: Glukoz molekülünün açık zincir yapısı halkalı yapıya döndüğünde α - ve β - anomerleri meydana gelir (Varki et al., 2009).

2.2 Glikozilasyon Tipleri ve Glikan Biyosentezi

Biyolojik sistemlerdeki protein glikozilasyonu en çok N-glikanlar, O-glikanlar ve glikozaminoglikan (GAG) ailesinden oluşur. Glikan biyosentezi proteinlerden farklıdır ve proteinler gibi belirli bir kalıba bağlı gerçekleşmez. Glikanların proteinlere bağlanmasını glikoziltransferaz enzimleri gerçekleştirir (Taylor and Drickamer, 2006). Protein glikozilasyonu oldukça çeşitlidir ve temel olarak iki ana grupta incelenebilir. Protein zincirinde asparajin aminoasidi (Asn) amid grubu üzerindeki azot (N) atomu üzerinden kovalent bağla şekerlerin bağlanması ile oluşan glikan tipine N-Glikanlar denir. Yine protein zincirinde serin (Ser) veya treonin (Thr) aminoasidi hidroksil grubundan şekerin bağlantı kurmasıyla O-glikanlar meydana gelir (Haltiwanger and Feizi, 2011).

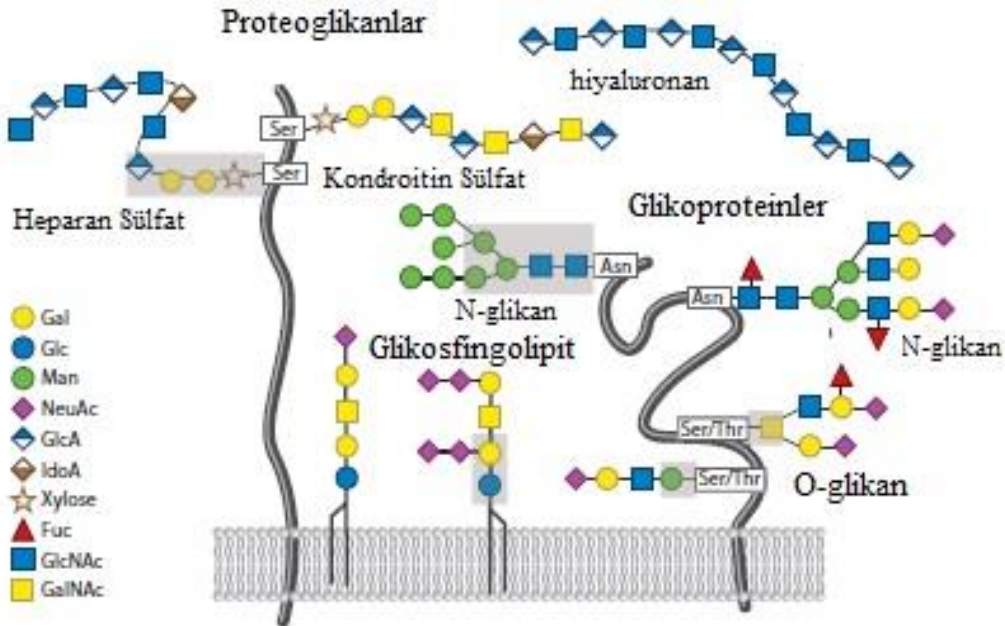
N-Glikanlar: Omurgalılarda post-translasyonel modifikasyonların en önemlilerinden bir tanesi oligosakkaritlerin protein üzerinde spesifik bir noktaya kovalent bağlanmasıdır. N-glikan biyosentez süreci Endoplazmik Retikulumda (ER) başlar. Golgi ve ER organellerinde işlenen proteinlerin yaklaşık yarısında N-glikozilasyon gözlenir. Asn-Xaa-Ser/Thr motifine sahip bir protein multi-enzim kompleksleriyle, oligosakkariltransferazlar, glikozillenir (Bause, 1983; Kornfeld and Kornfeld, 1985; Helenius and Aebi, 2001; Chavan and Lennarz, 2006).

Çizelge 2.1: Monosakkaritlerin molekül yapıları ve sembolleri

Monosakkarit	Sandalye Konformasyonu	Sembol
β -D-Glukoz (Glc)		
β -D-Mannoz (Man)		
β -D-Galaktoz (Gal)		
β -D-N-Asetilglukozamin (GlcNAc)		
β -D-N-Asetilgalaktozamin (GalNAc)		
β -D-Ksiloz (Xyl)		
α -L-Fukoz (Fuc)		
α -N-Asetilnöraminik asit Sialik asit (NeuNAc)		

N-glikozilasyon biyosentez yolları oldukça ayrıntılı çalışılmıştır. ER zarında dolikole bağlı $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ yığınının proteine transfer edilmesi ile N-glikozilasyon süreci başlar. Asn-Xaa-Thr/Ser motifinde asparajine bağlanan bu oligosakkarit yığını çeşitli glikozidaz enzimleri ile yeniden şekillendirilir ve Golgiye aktarılır. Bu aşamada proteine aktarılan N-bağlı oligosakkarit özel enzimlerle kompleks, hibrit ve yüksek mannoz olmak üzere üç farklı grupta yapıya dönüştürülür. Şekil 2.3'te N-glikan yapılarına ilişkin örnekler gösterilmiştir. (Bause and Legler,1981; Ellgaard and Helenius, 2001; Ruddock and Molinari, 2006). Bütün memelilerde ve birçok hayvan hücresinde biyosentetik öncü olan $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosakkaritinin enzimatik reaksiyonları sonrası meydana gelen üç mannozil-kitobioz N-glikan çekirdeği ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) ortak yapı olarak bulunur (Dell and Morris, 2001).

O-Glikanlar: Serin veya treonin aminoasitlerinin hidroksil grubuna oksijen atomundan bağlanan şekerler O-bağlı glikanları oluştururlar (Şekil 2.3). Tarihi perspektifte ele alındığı zaman, GalNAc monosakkaritinin proteine α -konfigürasyonu ile bağlanmasıyla meydana gelen yapılar musin tip O-glikanlar olarak bilinmektedir. ER ve Golgide proteinin olgunlaşma sürecinde GalNAc transferazlar sayesinde O-glikan sentezi başlar (Steen et al., 1998; Gill et al., 2011).

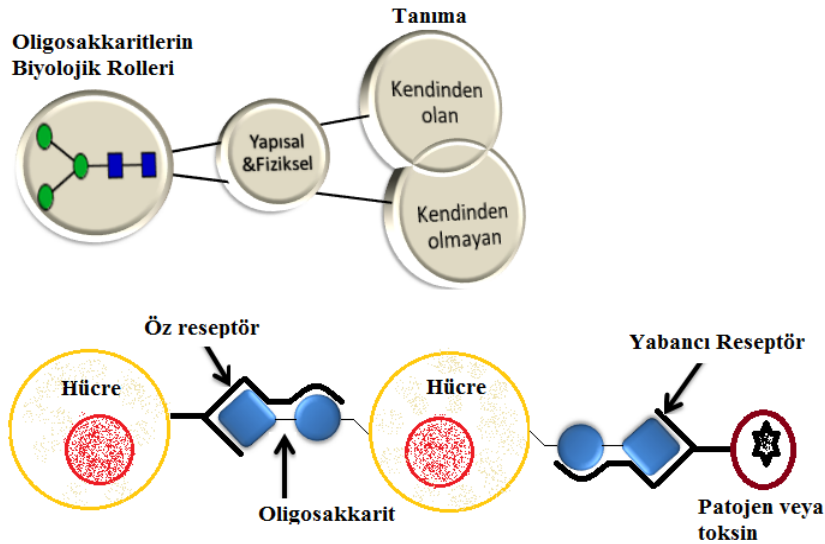


Şekil 2.3: N- ve O-glikanlar ile GAG sembolik biçimleri (Rillahan and Paulson, 2011).

2.3 Glikanların Biyolojik Rollerini

Glikanların biyolojik rollerini ifade edilirken organizmanın gelişimi, büyümesi, fonksiyonları ve hayatta kalabilmesi için çok önemli oldukları ifade edilebildiği gibi sıradan yapılar olarak da gösterilebilmektedir. Genel ilkeler değerlendirildiğinde, bir oligosakkarit yığını aynı organizmada farklı evre ve ortamda farklı işlev yerine getirebilir. Dolayısıyla doğrudan bir fonksiyon tahmin etmek kolay olmayacaktır. Proteinlerin yapı ve stabilitelelerinin korunmasına yardım etmek, mikroorganizma, toksin ve antikorlar için reseptör olmak veya onu maskelemek, proteinlerin yarı ömrünü kontrol etmek, hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimini sağlamak, proteinlere “açma-kapama” görevi sağlamak, temel görevler olarak bildirilmiştir (Varki, 1993).

Karbohidrat tanıma mekanizması biyolojik görevler içinde en önemlilerinden biridir ve gliko-tanıma biçiminde de tanımlanabilir (Şekil 2.4). Reseptör-Ligant ilişkisi ile tanımlanan süreçte, reseptör bir lektindir ve ligant ise oligosakkaritler olup protein veya yağ üzerinde bulunmaktadır. Ca^{2+} iyonu ile fonksiyon yapabilen lektinlere C-tip lektin, mannoz-6-fosfat bağlayan lektinlere P-tip lektin, immunoglobulin benzeri lektinlere de I-tip lektin adı verilmektedir.



Şekil 2.4: Oligosakkaritlerin biyolojik rollerini. Glikanların bilinen birçok görevi vardır. Temel olarak, molekülün fiziksel ve yapısal etkisine göre ve tanıma mekanizmasına göre iki gruba ayrılabilir. Tanıma mekanizması da ikiye ayrılır. Bunlar kendinden olan ve kendinden olmayan tanımlardır (Gagneux and Varki, 1999).

Hücre tutunması ve inflamasyonda, viral ve bakteriyel enfeksiyonlarda, fertilizasyonda, biyo-belirteçlerde, glikoimmunolojide, terapötik ajan üretiminde ve daha birçok alanda karbohidratların ve ya glikanların görevleri açıklanmıştır (Wang and Boons, 2011). Lenfositler yüzeyinde birçok fonksiyonel glikoprotein yer aldığı ve yapısında O-glikanların yoğun bulunduğu bildirilmiştir. Çekirdek-2 yapısındaki O-glikanların immun yanıtta anahtar rol oynadığı, T-hücrelerinin aktivitesinde bir glikoprotein olan CD43'ün O-glikanlarının etkili olduğu belirlenmiştir (Tsuboi and Fukuda, 2001).

2.4 Glikanların Yapısal Analizinde Analitik Yaklaşımlar ve Glikomiks

Genomiks, nükleik asitlerin, proteomiks proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkisini inceler. Glikan yapı-fonksiyon ilişkisini tanımlayan alan ise **glikomiks**'tir. Karmaşık glikan yığınlarının analizinde yapının varlığını açıklamanın yanında miktarını da belirlemek önemlidir. Birçok uluslararası çalışmanın tek bir havuzda toplanabilmesi ve verilere kolayca ulaşılabilmesi için internet tabanlı veri bankaları kurulmuştur. Bunlardan biri de "The Consortium for Functional Glycomics"dir (Shriver et al., 2004).

Glikan yapılarındaki dallanmalar, anomerik konfigürasyon, bağ tipi, monosakkarit tipi gibi karmaşıklıklar yapısal analizin daha zor olmasına sebep olur. Biyolojik materyalden hedeflenen molekülün elde edilmesi ve bunun az miktarda olması analitik glikobiyolojinin zorlandığı alanlardır. Son zamanlarda üretilen yüksek hassasiyetli ve yazılım destekli analitik sistemler sayesinde glikomiks yaklaşımla veri eldesi daha sağlıklı olmaktadır. Sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektrometresi (MS) ve bu ikilinin birleşik hali (LC-MS) çok efektif sonuçların elde edilmesini sağlamıştır (Morelle and Michalski, 2005).

2.4.1 Sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, polarite farkı olan iki katman arasında moleküllerin ayrımını sağlayan, katmanlardan hareketli olanın sıvı ve hareketsiz olanın da katı olduğu, otomatize edilmiş bir sistemdir. Ayırma işleminin yapılabilmesi için birkaç farklı teknik geliştirilmiştir. Ters-faz kromatografisi,

normal-faz kromatografi, iyon-değişim kromatografisi, afinite kromatografisi, boyut kromatografisi vs bunlardan bazılarıdır.

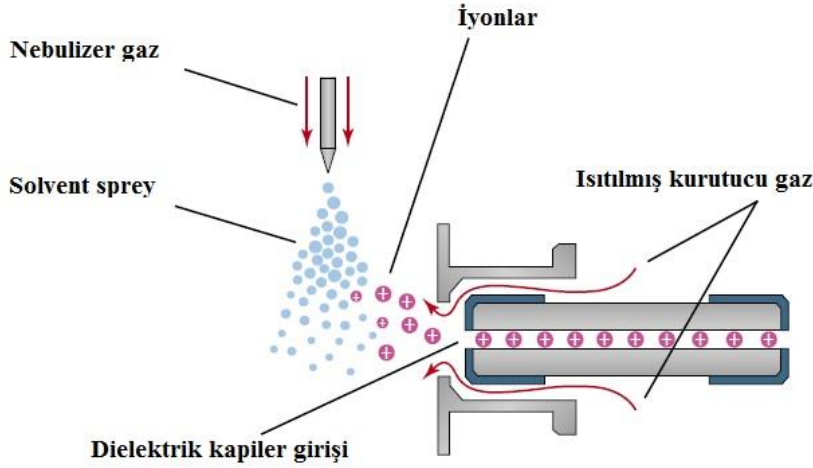
Glikanlar protein zincirinden koparıldıktan sonra alditol formunda bulunurlar. Bu yapıların HPLC analiz hassasiyeti düşüktür. Dolayısıyla daha verimli bir analiz yapılabilmesi ve HPLC sinyalinin yüksek seviyede oluşabilmesi için floresan bir moleküle işaretlenmesi (türevlendirilmesi) gerekir. Bu floresan ajanlardan en çok kullanılan 2-aminobenzoik asit, 2-aminopiridin, 2-aminobenzamid, 2-aminoantranilik asittir. Bazı glikanların yapıları çok benzer olabilir ve hatta izomerik moleküller olabilirler. Bunların HPLC sisteminde ayrılmaları mümkün olmayabilir. Yapı analizi için ortaya çıkan en başarılı metotlardan biri de ekzoglikosidazların kullanılmasıdır. Böylece belirli bir monosakkaritin enzim kullanılarak ana yapıdan uzaklaştırılması ve tekrar HPLC ile analizi sayesinde yapı çözümlenebilmektedir. Yukarıda belirtilen türevlendirici ajanların dışında permetilasyon yöntemi ile türevlendirilen glikanlar daha apolar karakter kazandığı için ters-faz kromatografi ile verimli biçimde analiz edilebilmektedir (Merry and Astrautsova, 2009).

2.4.2 Kütle spektrometresi (MS)

Kütle spektrometresi yüklü iyonların (analit) kütle/yük (m/z) değerini ölçen sistemlerdir. Temel olarak üç kısımdan meydana gelir. Bunlardan birincisi iyonlaştırma ara yüzeyidir ve moleküllerin gaz fazında iyon biçiminde olmalarını sağlar. İkincisi kütle analizörüdür ve iyonların ayrımını seçimli yapabilen elektriksel akım ve radyo frekansla çalışan birimdir. Üçüncüsü ise bu iyonların miktarını yani kütle spektrometresi sinyalini oluşturan kısım olan detektördür. Kütle spektrometresi iyonlaştırma ara yüzeylerinden en çok kullanılanları ESI (elektrosprey iyonizasyon) ve MALDI (matriks destekli lazer iyonizasyon) sistemleridir.

ESI: Uçucu olmayan moleküllerin de gaz faz iyonlarının elde edilebilmesini sağlayan bir araçtır (Şekil 2.5). HPLC veya benzer cihazdan gelen sıvı nebulizer sayesinde spreye dönüştürülür. Oluşan spreysel elektriksel bir alandadır ve bu spreysel 150-350°C sıcak azot gazı püskürtülür. Spreysel içindeki

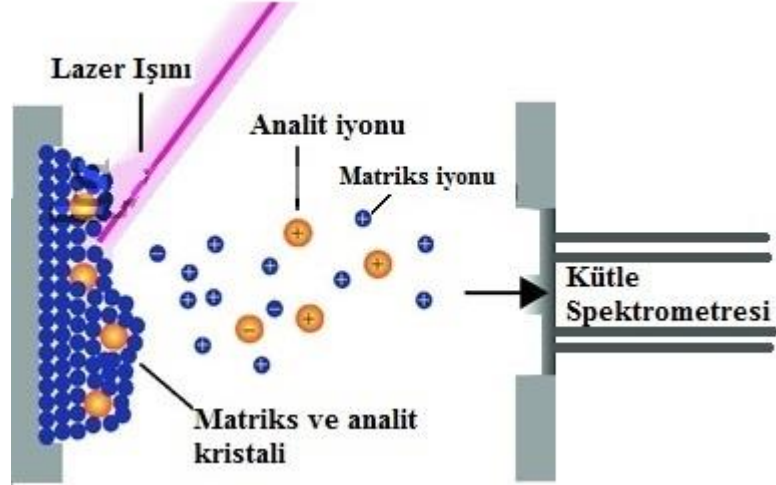
damlacık bu sayede kuruyarak küçülme eğilimindeyken Coulomb patlaması adı verilen fiziksel nedenle büyüme eğilimine girer. Bu iki kuvvet arasında kalan moleküller bir anda gaz faz iyonla dönüşürler ve MS sisteminde analiz edilebilecek duruma dönüşürler. Bu sayede sıvı fazdaki maddeler MS ile analiz edilebilmektedir (Fenn, 1989; Gaskell, 1997).



Şekil 2.5: ESI şematik görünümü (Agilent Technologies)

MALDI: Temel prensip, UV ışını soğurabilen bir matriks içine gömülen örneğin bu materyal sayesinde foto-iyonizasyon metoduyla iyonlaştırılmasıdır (Şekil 2.6). İyonun bu ortamda nasıl meydana geldiği tam olarak bilinmemekle beraber birkaç teori önerilmiştir. MALDI sisteminde matriks seçimi verimi büyük oranda etkiler. 2,5-dihidroksibenzoik asit oligosakkarit analizinde başarıyla kullanılan bir maddedir. En çok kullanılan ışın kaynağı ise N_2 lazer olup dalga boyu 337 nm'dir. MALDI sisteminin en önemli özelliği proteinler gibi çok büyük ağırlıklı molekülleri bile tek yükle iyonlaştırabilmesidir. $[M+H]^+$ veya $[M+Na]^+$ biçiminde pozitif pseudo-moleküler iyonlar oluşur. (Zenobi and Knochenmuss, 1998; Marvin, et al., 2003).

Kütle Spektrometresi (MS) analizörleri çok çeşitli olmakla beraber, en yaygın olarak iki tipi kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi uçuş zamanlı (TOF) ikincisi iyon-tuzak (Ion-Trap) yapılarıdır. İyonlaştırıcı ara yüzey ile analizör kombinasyonu MALDI-TOF-MS ve ESI-Ion-TrapMS olarak kullanılmıştır. Ayrıca iyon-tuzak sisteminde HPLC birleşimiyle LC-ESI-Ion-TrapMS kullanılmıştır.

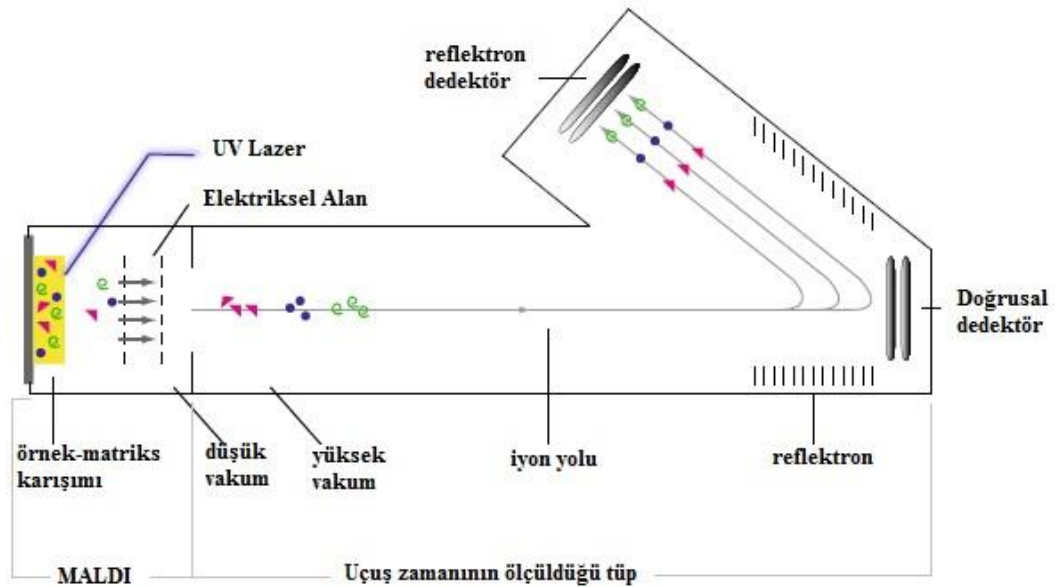


Şekil 2.6: MALDI şematik gösterimi. Analiti içeren çözelti ile matriks adı verilen ve iyonlaşmaya destek olan çözelti tabla üzerinde karıştırılarak kristal haline getirilir. Oluşan kristal üzerine N₂ lazer ışını gönderilerek iyonların oluşması sağlanır (Shah et al., 2011).

MALDI-TOF-MS: İyonların uçuş zamanını aşağıdaki formüle dayalı olarak hesaplayan ve böylece m/z değerini kaydeden sistemler uçuş zamanlı kütle spektrometreleri (TOF) olarak adlandırılır. Aynı yüke sahip olan küçük kütleli iyonlar daha hızlı hareket edeceğinden detektöre önce ulaşır (Şekil 2.7).

$$t = \sqrt{s \left(\frac{m}{(2KE)z} \right)}$$

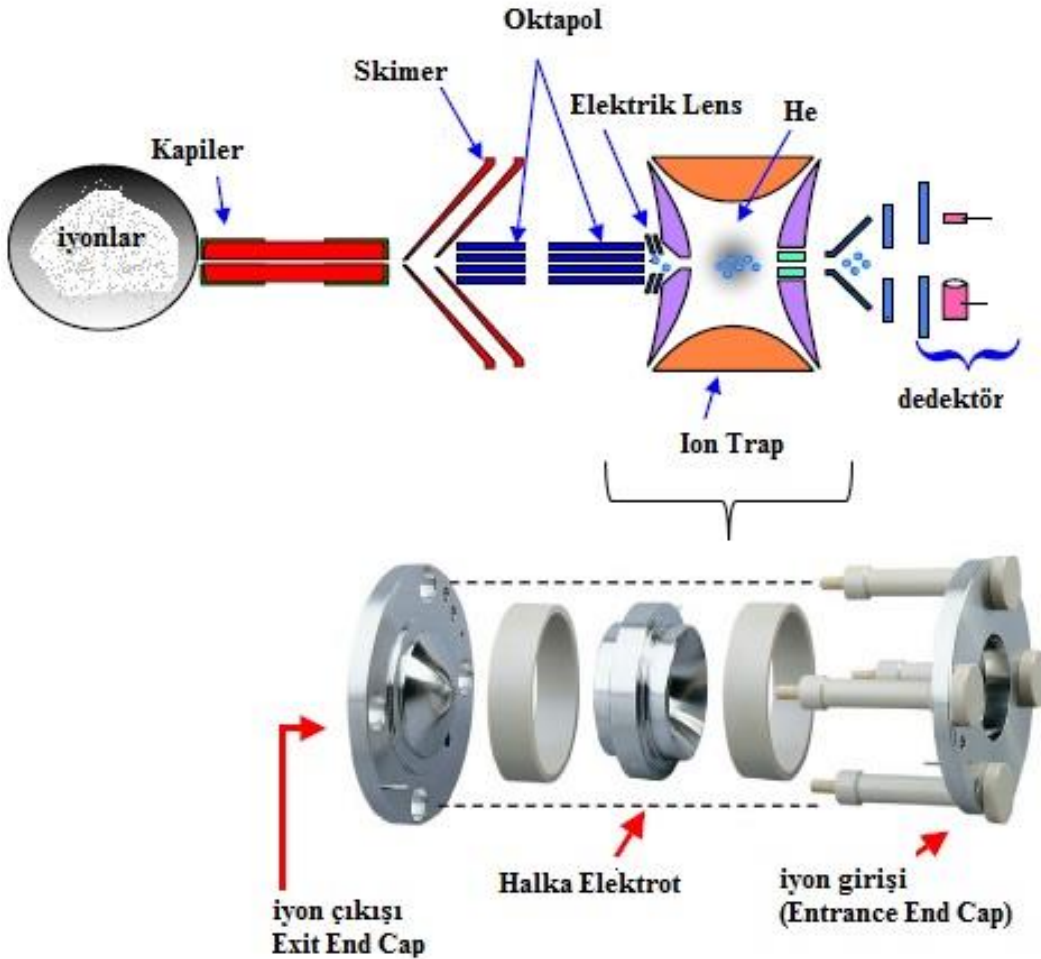
t:süre, **s:** uzunluk, **m:**kütle, **KE:** kinetik enerji, **z:**iyon yük sayısı



Şekil 2.7: MALDI-TOF şematik görünümü (Shah et al., 2011).

Biyomoleküllerin kütleleri görece büyüktür ve tek yüklü iyonlarının oluşturulması avantajdır. Bunu yanında TOF sistemleri sayesinde büyük kütleli iyonların m/z değerleri daha verimli analiz edilir. Dolayısıyla MALDI-TOF protein, peptit ve oligosakkarit analizinde oldukça avantajlıdır.

LC- ESI-Ion Trap MS: Ion Trap MS çalışma prensibinde iyonlar özel yapıya sahip bir metalik kapan içinde hapsedilir. Burada çok kısa zaman tutulabilir ve bu arada istenmeyen iyonlar kapandan dışarı atılır. Ion trap içinde kalan iyonlar istenirse parçalanarak MS/MS spektrumu elde edilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Ion Trap şematik gösterimi ve Bruker Ion Trap ticari yapısı.

2.4.3 MALDI-TOF-MS ve LC- ESI-Ion Trap MS ile glikan analizi

Glikomiks ve glikoproteomiks çalışmalarında glikan yığınının kütesinin tespiti sayesinde monosakkarit bileşenleri bulunabilmektedir. İzomerik ve çözümlenmesi zor kütleler için ise MS/MS tekniği kullanılır. Bu teknik ile iyonlar TOF veya Ion Trap içinde inert bir gazla çarpıştırılarak parçalarına ayrılır ve bu parçalanma iyonlarından faydalanılarak yapı karakterize edilir. Parçalanma iyonları bağların kopma noktasına göre tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. Monosakkaritlerin bağ tipleri bu teknik ile aydınlatılamaz ve bunun için GC/MS kullanılmalıdır. MALDI-TOF ve Ion Trap MS ile Hek, HekNAc, Sia vb tipler bulunur. Sadece HPLC ile yapılacak analizler için glikan standartları ve birçok özel glikozidazlar gerekiyken MS sistemlerinde MS/MS parçalanma iyonları ile bunlara gerek kalmadan yapı aydınlatılabilmektedir (Domon and Costello, 1988; Leymarie and Zaia 2012).

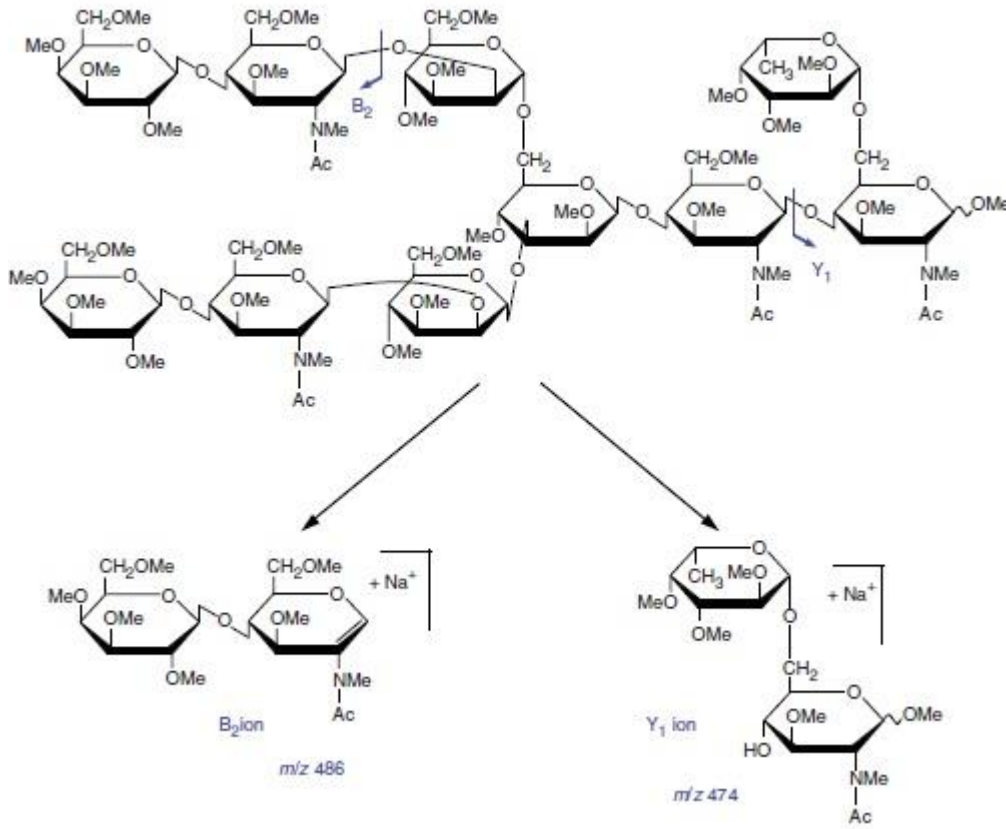
Glikokonjugatlardan serbest bırakılan oligosakkaritlerin MS analizlerinin verimli olabilmesi için türevlendirme yapılabilir. Permetilasyon sonrası bütün hidroksil grupları metillendirilerek glikanların iyonlaşma niteliği artırılmış olur ve böylece MS yanıtı da yüksek olur (Dell and Morris, 2001). Glikanların serbest bırakılmasıyla oluşan alditol yapısı negatif mod MS ile analiz edilebilir. Terminal kısımda sialik asit bulunduran yapılar negatif modda daha iyi analiz edilir. Diğer nötral yapıdaki glikanları da negatif modda çalışabilmek için asidik özellikteki 2-aminobenzoik asit ile türevlendirilir. Böylece bütün yapılar negatif modda çalışılır. Permetilasyon sayesinde karboksil grubu esterleştirilen sialik asit MALDI-TOF sisteminde pozitif modda sodyum iyonu ile daha iyi sinyal oluşturur. Ayrıca glikozidik bağların kırılması sonrası yapı hakkında daha detaylı bilgi edinilir. LC-ESI-Ion-TrapMS çalışmalarında da permetillenmiş glikanlardan oldukça fazla bilgi elde edilir (Wuhrer, 2013).

MS/MS (tandem MS) parçalanma iyonları ile yapı hakkında daha fazla bilgi edinilir. Eğer glikan zinciri proton alarak ($[M+H]^+$) iyonlaşmış ise MS/MS yapıldığında HekNAc yapılarının indirgen kısımlarından kopmalar olur ve bu iyonlar özellikle kompleks N-bağlı glikanlarda daha fazla gözlenir. Yüksek mannoz N-glikanlarda ise Heksoz kopmaları gerçekleşir ve böylece daha tek tip

iyonlar oluşur, diğer N-glikanlara göre daha kolay tahmin edilebilecek parçalanma iyonları spektrumu oluşur. Tüm bu CID MS/MS parçalanma iyonları ile N-glikan yapılarının sınıfı (yüksek mannoz, kompleks, hibrit) aydınlatılabilir (Zaia, 2004).

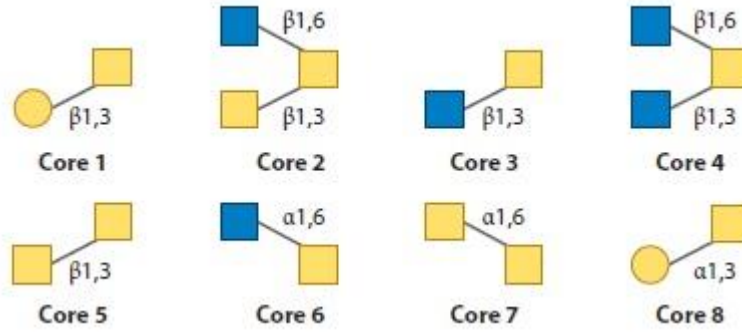
Kütle spektrometresi glikan profilinin belirlenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Elde edilen spektral verilerin değerlendirilmesinde daha hızlı, doğru ve güvenilir sonuçlar ortaya koyabilmek yazılım geliştirilmiştir. GlycoworkBench bu konuda en kullanışlı olanlardan biri olup yine veri kaynağı olarak da uluslararası internet bankalarını kullanmaktadır (Ceroni et al., 2007).

Permetillenmiş glikanların parçalanmaları ile daha çok B ve Y tip iyonlar gözlenir (Şekil 2.9). B tip iyonlar sıklıkla HekNAc bağlı glikozidik bağların kopmasıyla gözlenir. Bu durumda yük indirgen olmayan uçta sınırlandırılmış olur. Bu parçalanmalar sayesinde N-glikanların anten yapıları ortaya çıkarılır (Morelle and Michalski, 2007).



Şekil 2.9: Permetillenmiş glikanların sodyum ekli iyonlarının glikozidik bağ kırılması ile oluşan parçalanma iyonları (Morelle and Michalski, 2007).

O-glikanlar da MS sisteminde benzer şekilde analiz edilirler. Türevlendirme ve permetilasyon gibi seçenekler mevcuttur. Glikanların proteine bağlı kısımdan koparılması ile reaksiyona açık olan kısım bir floresan ajan tarafından türevlendirildiğinde hem MS iyon şiddeti yükselir hem de yapı analizi daha verimli olur. O-glikanlar fazla sayıda çekirdek yapıya sahiptir (Şekil 2.10), N-glikanlar gibi bir tane çekirdek yapı üzerinden şekillenmezler.



Şekil 2.10: O-glikan çekirdek yapıları (Alley and Novotny, 2013).

O-glikan analizinde türevlendirici ajanlardan PMP kullanılarak yapılan analizler özellikle LC-ESI-MS/MS sistemlerinde başarı göstermiştir. Bazık ortamda protein zincirinden ayrılan O-glikanlar PMP ile türevlendirildikten sonra ön temizlik aşamasının ardından LC-MS sisteminde analiz edilebilecek hale gelir. Bu sayede glikan analizlerindeki en önemli tartışma konusu olan örnek hazırlama süresi minimum düzeye indirilmiş olur. İki mol PMP ile bir mol glikan yapısının reaksiyonu ile meydana gelen yapı ticari olarak satılan fetuin glikoproteini ve insan serumu gibi doğal örneklerde çalışılmış ve tekrarlanabilir sonuçlar üretilebildiği gözlenmiştir (Honda et al. 2003; Wang et al., 2011; Furukawa et al., 2011; Zauner et al., 2012).

2.5 Döllenmede Glikanların Rolü

Döllenme iki hücrenin spesifik etkileşimidir. Sperm ve yumurta birbirlerini bulabilmelidir ve birbirlerine bağlanmalıdır. Bu bağlanma türler içinde veya belirli kısıtlama mekanizmalarıyla iki tür arasında olur. Glikanların döllenmedeki rollerinin araştırılması amacıyla ekinodermiler (denizkestanesi ve denizyıldızı), amfibiler (*Xenopus laevis*), ve memeliler (fare) model organizma olarak

incelenmiştir. Glikanların rolü üzerine ilk çalışmalar denizkestanesinde yapılmıştır. Çapraz dölleme gamet tanıma engeli ile durdurulur. Bu engel spesifik glikozidik bağ, sülfat grubunun şeker molekülündeki konumu, sialik asit çeşidi veya bağ tipi farklılığı biçiminde olabilir. Engellemede etkili olan bu glikanlar yumurta hücre zarının dış kısmında bulunan ve yumurta jel kılıfı olarak adlandırılan katmanda bulunur. Benzer biçimde denizyıldızı çalışmalarında da polimerik ve sülfatlanmış glikanların döllemede etkili olduğu tespit edilmiştir (Wang and Boons, 2011).

Amfibilerde yumurta üç jel katmanla sarılıdır ve altında vitellin katmanı bulunur. Bu yapılarda döllemeyi kontrol eden glikanların varlığı bildirilmiştir. *X. laevis* türünde yapılan çalışmalarda N-glikanlar ve O-glikanlar tespit edilmiştir (Vo et al., 2003).

İnsan ile ilgili çalışmalar 1938'de başlamıştır. Yumurtayı saran matrikse zona pellusida (ZP) adı verilmiştir. Gelişmiş sistemler ile sonra yapılan çalışmalarda yüksek miktarda N-glikan ve terminal olarak da sialil-Lewis^x (sLe^x) bulunduğu tespit edilmiştir. sLe^x aynı zamanda siglek-9 için ligand olup döllemenin yanında yumurtaya immun özellik de kazandırdığı varsayılmaktadır. Döllemede reseptör-ligand mekanizmasının asıl fonksiyonu gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Clark, 2013).

2.6 Yumurta Jel Kılıfında Glikanlar

Denizkestanesi yumurta jel kılıfı ile uzun zaman önce yapılan çalışmalarda jel kılıfın pH:5,8-5,1 arasında yumurtadan uzaklaştığı belirtilmiş ve izolasyonda bu tekniğin uygulanabildiği bulunmuştur. Jel kılıfın %20-25 oranında protein-peptit, %75-80 oranında polisakkarit yapıda, kükürtün yüksek oranda ester bağlı biçimde ve monosakkaritlerin çoğunlukla sülfatlı olduğu tespit edilmiştir. Bazı türlerin sülfat oranının daha düşük olduğu da belirlenmiştir (Vasseur, 1948).

Farklı denizkestanesi türlerinin yumurta jel kılıfı glikoproteinlerine ilişkin çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Strongylocentrotus purpuratus* türü denizkestanesinde yumurta jel katmanına PNGaseF enzimi uygulanmış ve kalan

kısmın akrozom reaksiyon vermediği gözlenmiştir. Enzim ürününün karbohidrat yapıda olduğu test edilmiş ve akrozom reaksiyonundan N-glikozilasyonun sorumlu olduğu belirlenmiştir (Keller and Vacquier, 1994). *Strongylocentrotus franciscanus* türünde yumurta jel kılıfında 2-O sülfatlı fukoz ile 4-O sülfatlı fukoz (α -L-fukan) izole edilmiş ve tespit edilmiştir. Sülfatlı polisakkaritlerin tanımda önemli olduğu bildirilmektedir. Bu durumda 2-O ve 4-O oranı türler arası sperm akrozom reaksiyonun başlangıcında etkindir (Vilela-Silva et al., 1999). Denizkestanesi yumurta jel kılıfında monosakkarit bileşkelerinde genellikle α anomerik konfügrasyon gözlenir. Fakat *Glyptocidaris crenularis* türünde sülfatlı (polimerik galaktoz) yapısı tespit edilmiştir. 2-sülfatlı β -Galaktan ile sülfatlı olmayan 3-bağlı galaktan gözlenmiştir. Bunun yanında ekinoderm yumurta jel kılıfta ortak gözlenen sialoglikoproteinler bu türde bulunmamıştır (Castro et al., 2009).

Glikomik teknikler alanında, *Xenopus borealis* türü kurbağa yumurta jel kılıfında yapılmış çalışma ile O-bağlı oligosakkaritlerin yapı analizi MALDI-IRMPD ve ekzoglikozidazlar kullanılarak aydınlatılmıştır (Li et al., 2011).

Hemicentrotus pulcherrimus tür denizkestanesi yumurta jel kılıfından izole edilen fukoz sülfat glikokonjugat SDS-PAGE sisteminde analiz edilmiş 258 kDa ve 237 kDa değerinde iki majör bant ve 120 kDa değerinde bir bant gözlenmiştir. Ayrıca bu bantların ham yumurta jel kılıfında da temel bantlar olduğu tespit edilmiştir (Shimizu et al., 1990). Daha önceki çalışmalarda yumurta jel kılıfının yapısal özelliklerine ilişkin bildirimlerde bulunulmuştur. *H. Pulcherrimus* tür denizkestanesi yumurta jel kılıfında en fazla 0,1 mg/mL protein bulunduğu tespit edilmiştir (Shimizu et al., 1990).

Aralarında *Paracentrotus lividus*'un da bulunduğu sekiz farklı denizkestanesi türünde yumurta jel kılıfının %75-80 oranında polisakkarit bileşenlerinden ve %20-25 oranında da protein peptit yapıdan oluştuğu bildirilmiştir (Vasseur, 1948). *P. lividus* türü yumurta jel kılıfında kağıt kromatografisi ile yapılan analizde yoğun miktarda fukoz ve sialik asit (Neu5Ac) bulunduğu bildirilmiştir (Immers, 1968).

Pseudocentrotus depressus tür denizkestanesi yumurt jel kılıfında majör bileşenlerden birinin fukoz olduğu bildirilmiştir. Fukopiranozil(1→4)glikolil nöraminik asit tip disakkarit varlığına dikkat çekilmiştir. Memelilerde fukoz ve sialik asidin terminal şeker olduğu bilinmekle beraber bu ornanizmada yeri soru işareti olarak kalmıştır (Hotta and Kurokawa, 1973). Dört farklı denizkestanesi türü yumurta jel kılıfında ise ortalama %25 fukoz, %25 protein, %15 sülfat, %15 sialik asit ve %2 heksozamin içerdiği tespit edilmiştir (SeGall and Lennarz, 1979).

H. pulcherrimus türünde jel filtrasyon kromatografisi ile izole edilen yumurta yüzey proteinlerinin fukozca zengin glikokonjugat olduğu tespit edilmiş ve bunun akrozom reaksiyonunu indüklediği belirlenmiştir (Yamaguchi et al., 1989). Yine aynı türde yapılan başka bir çalışmada jel kılıfın yüksek oranda fukoz sülfat glikokonjugat makromolekül içerdiği ve bu yapının da yüksek oranda fukoz içerdiği bildirilmiştir (Shimizu et al., 1990). *H. pulcherrimus* türünde ayrıca fukozca ve sialik asitçe zengin glikoprotein varlığı bildirilmiştir (Kitazume et al., 1994). *Strongylocentrotus franciscanus* yumurta jel kılıfında homofukan (fukoz polimer) 2-O sülfatlı ve 3-bağlı şeker yapısının varlığı bildirilmiştir (Vilela-Silva et al., 1999). *Glyptocidoris crenularis* yumurta jel kılıfında ise sülfatlanmış β -D-galaktan yapıda şekerler tespit edilmiş ve tekrarlı biçimde (3- β -D-Galp-2(OSO₃)-1→3- β -D-Galp-1)*n* bulunmuştur (Castro et al., 2009).

Sialik asit karboksilli yapısıyla anyonik niteliktedir. 8. Karbonunda SO³⁻ grubu taşıyan sialik asitler ilave anyonik grup ile özel bir nitelik taşırlar. Yapılan çalışmalarda denizkestanesi yumurtasının Neu5GcS ve sperminin Neu5AcS içerdiği bulunmuştur. (Yamakawa et al., 2007).

Immunboyama ile Neu5GcS'nin fertilizasyon katmanının dış yüzeyinde daha çok bulunduğu gösterilmiştir. *H. pulcherrimus* tür denizkestanesi yumurta jel kılıfında %87 Neu5Gc ve %13 Neu5GcS bulunduğu, *Strongylocentrotus purpuratus* türünde ise %98 Neu5Gc ve %2 Neu5GcS bulunduğu bildirilmiştir (Miyata et al., 2004, Yamakawa et al., 2007).

Paracentrotus lividus türü Akdenizde yaşayan denizkestanesi yumurta jel kılıfında kâğıt kromatografisi ile yapılan analizde mikrodensiyometrik ölçümü

sonucunda yoğun miktarda sialik asit (Neu5Ac) bulunduğu bildirilmiştir (Immers J, 1968). *Pseudocentrotus depressus* tür denizkestanesi yumurta jel kılıfında ince tabaka kromatografi, kızılötesi spektrum ve enzimatik uygulamalarla N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc) bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında N-asetoglikolil-4-metil-4,9-dideoksi nöraminik asitde bulgular arasındadır (Hotta et al., 1970).

P. depressus tür denizkestanesi yumurta jel kılıfında kalorimetrik analizler sonucunda 1:1 oranında fukoz:glikolil nöraminik asit bulunmuştur. C8 ve C9 karbonunda hidroksil gruplarının süstitüye olmadıkları belirtilmiştir. Neu5Gc tip sialik asidin C4 hidroksil grubuna fukoz bağlı olduğu belirtilmiştir. Memelilerde fukoz ve sialik asidin terminal şeker olduğu bilinmekle beraber bu organizmada yeri soru işareti olarak kalmıştır (Hotta and Kurokawa., 1973).

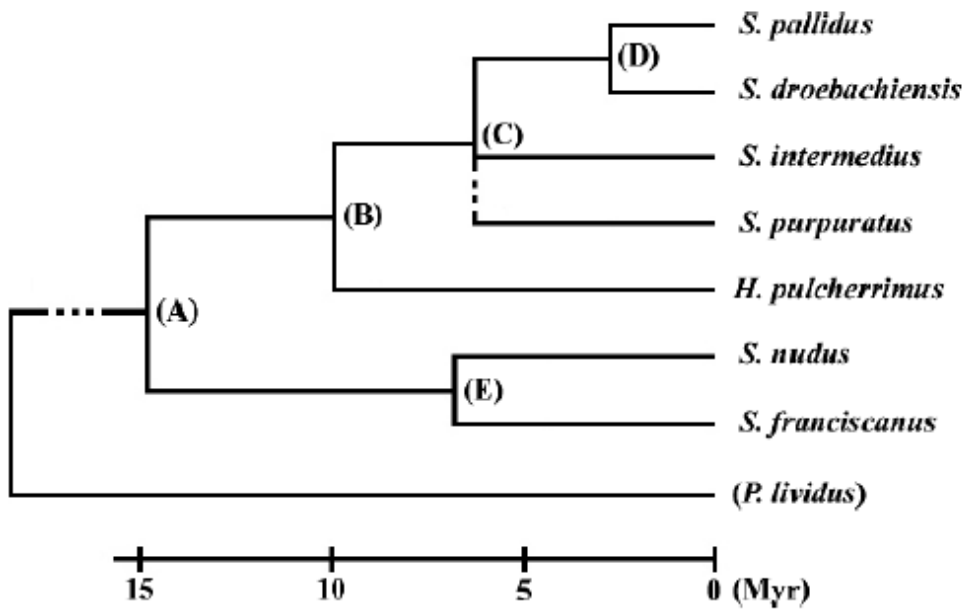
Yumurta jel kılıfının yüksek miktarda sülfat ve fukoz içeren bunun yanında daha az miktarda sialik asit, heksozamin ve protein içeren bir kompleks olduğu belirtilen çalışmada dört farklı denizkestanesi türü yumurta jel kılıfında ortalama %25 fukoz, %25 protein, %15 sülfat, %15 sialik asit ve %2 heksozamin içerdiği tespit edilmiştir (Segall and Lennarz, 1979).

H. pulcherrimus türünde jel filtrasyon kromatografisi ile izole edilen yumurta yüzey proteinlerinin fukozca zengin glikokonjugat olduğu tespit edilmiş ve bunun akrozom reaksiyonunu indüklediği belirlenmiştir. Ham jel kılıf materyali için 25,6 nmol/16,4 µg oranında sialik asit tespit edilmiştir (Yamaguchi et al., 1989). *H. pulcherrimus* türü denizkestanesi yumurtalarından izole edilen jel kılıfın yapısında bulunan sialoglikoproteininin ağırlıkça %90 oranında sialik asit içerdiği ve akrozom reaksiyonunu indüklemediği belirlenmiştir. Sialik asit ile ilgili çalışmalar sadece Neu5Ac standart kabul edilerek spektrofotometrik olarak yapılmıştır (Shimizu et al., 1990).

H. pulcherrimus türünde O-bağlı oligosakkaritlerin terminal birimine poliNeu5Gc zincirinin ekli olduğu bildirilmiştir. Polisialik asit biriminin fertilizasyonda rol aldığı ifade edilmiş ve bunun Ca⁺⁺ iyonu ile işbirliği içinde gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Kitazume et al., 1994). *Glyptocidoris crenularis*

yumurta jel kılıfında ise sülfatlanmış polisakkaritler, sialoglikanlar ve peptitlere işaret edilmiştir (Castro et al., 2009).

Evrim sürecinde *P.lividus* tür denizkestanesinin diğer türlere göre değişmeksizin günümüze kadar yaşamını sürdürdüğünü gösteren çalışmalar (Lee, 2003) (Şekil 2.11) bu türün özel yapısını ortaya koymaktadır. Bu sayede sadece fertilizasyon değil, onun da ötesinde türleşmenin de moleküler açıklamalarına özellikle glikobiyolojik açıdan cevapların bulunabilmesi ilgi çekicidir.



Şekil 2.11: Moleküler saat çalışması sonrası elde edilen tür benzerlikleri (Lee, 2003).

Yumurta jel kılıfında bulunan sülfatlı şekerlerin türe özgü akrozom reaksiyonunu başlattığı bildirilmiştir. Birbirinden evrimsel açıdan uzak akraba olan türlerde benzer glikan özelliklerinin bulunabilmesi ise yakınsak veya çakışan evrim teorisiyle açıklanmıştır (Vilela-Silva et al., 2008).

Denizyıldızı yumurta jel kılıfında akrozom reaksiyonunu indükleyen şekerlerin sülfatlı glikan olup proteoglikan yapıda ve oldukça uzun bir moleküler yapıda olduğu bildirilmiş, bununla ilişkili genlerin tüm ekinodermlerde gözlemlendiği fakat denizkestanelerinde bulunamadığı ifade edilmiştir (Hoshi et al., 2012).

Birçok türün yumurta jel kılıfının glikan yapısını aydınlatılmak üzere çalışılmıştır. *Xenopus laevis*'e ait yumurta jel kılıfında MALDI-FT-MS ve H-NMR sistemiyle birçok nötral ve asidik oligosakkaritler belirlenmiştir (Tseng et al., 1997, 2001; Strecker et al., 1995). Yine aynı türde polimorfik özelliklere bağlı olarak farklı glikan yapıları yumurta jel kılıfı glikanlarında tespit edilmiştir (Guerardel, 2000).

Bufo Arenum türü kurbağa yumurta jel kılıfında en fazla galaktoz olmakla beraber fukoz, N-asetil glukozamin ve N-asetik galaktozamin tespit edilmiştir. Bunun yanında sadece Neu5Ac tip sialik asit de spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada mannoz bulunmadığı bildirilmiştir. Bu bilgi ile yoğun biçimde O-glikan varlığı işaret edilmiş N-glikanların tespit edilemediği bildirilmiştir (Arranz et al., 1997).

Benzer biçimde bazı memeli türlerinde de analitik çalışmalar yapılmış ve glikan profili karakterize edilmiştir. Kemirgen yumurtasını kaplayan özel tabakanın (Zona Pellucida, ZP) yüksek mannoz, kompleks N-glikan ve çekirdek-2 tip O-glikan yapılarını taşıdığı bildirilmiştir (Easton et al., 2000).

Bazı memelilere ait ZP glikoprotein yapılarının benzerliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada şapkalı maymunların (bonnet) %94 ve tavşanın %70 civarında insan ZP ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Prasad et al., 2000).

Sığır (bovine) yumurtası ZP glikan analitiği çalışmalarında yüksek mannoz yapı tespit edilmiştir. Bu yapının sperm ligant aktivitesi için önemli olduğu belirlenmiştir (Amari et al., 1996; Katsumata et al., 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışma materyali

Çalışma materyali Denizkestanesi *Paracentratus lividus*'un yumurta jel kılıfıdır. Ergin denizkestaneleri (Şekil 3.1) Ege Denizi İzmir ili Foça ilçesi kıyısında, enlem 38°39'54,69''K ve boylam 26°44'29,01D koordinatlarından toplanmıştır (Şekil 3.2). Toplanan denizkestaneleri havalandırmalı tank ile uygun sıcaklıktaki deniz suyunda laboratuvara ulaştırılmıştır.



Şekil 3.1: Denizkestanesi *Paracentratus lividus* (orijinal). Ölçek 1 cm aralıklıdır.



Şekil 3.2: Ergin denizkestanelerinin toplandığı kıyı şeridi, Foça, İzmir

3.2. Yöntemler

3.2.1 Örnek hazırlama

3.2.1.1 Yumurta jel kılıfının elde edilmesi

Yumurtaların elde edilmesi için, 0,5 M KCl çözeltisinden her bir denizkestanesine 1-2 ml olacak şekilde, oral bölgenin çevresindeki perioral membrandan sölamik boşluk içerisine enjekte edilmiştir. Dişi hayvan ters çevrilip, içinde yapay deniz suyu bulunan bir kap içerisine yumurtaları bırakması sağlanmıştır (Şekil 3.3). Çizelge 3.1’de belirtilen tuzlardan hazırlanan yapay deniz suyu, her denemeden önce hazırlanmış ve taze olarak kullanılmıştır.



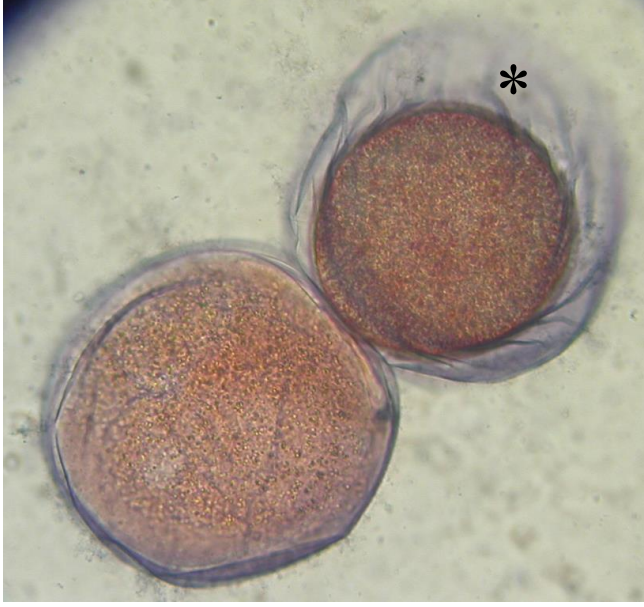
Şekil 3.3: Yumurtaların elde edilmesi

Çizelge 3.1: Yapay deniz suyu için kullanılan tuzlar ve miktarları

Tuz	g/L
NaCl	24,7
KCl	0,67
CaCl ₂ .H ₂ O	1,36
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,66
MgSO ₄ .7H ₂ O	6,29
NaHCO ₃	0,18
TOPLAM	37,86

3.2.1.2 Yumurta jel kılıfının izolasyonu

Yumurtaları saran jel kılıf ışık mikroskobu ile kolayca görülebilmektedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Yumurtayı dıştan saran jel kılıfın (*) stereo mikroskop ile görüntüsü.

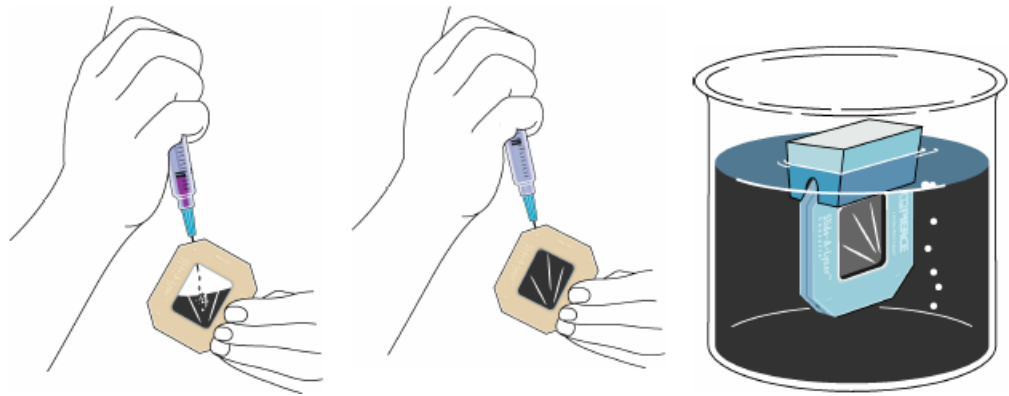
Yumurta jel kılıfının izolasyonu için literatürde üç farklı yöntem önerilmiştir. Bunlar β -merkaptotanol uygulaması, mekanik yollarla izolasyon ve asidik deniz suyu yöntemidir. Üç yöntem de uygulanmış, bunlardan asidik deniz suyu yöntemi (Shimizu et al., 1990) ile daha verimli **materyal** izole edilebildiği için tercih edilmiştir.

Asidik yöntemle jel kılıf izolasyonu için, yumurtanın içinde bulunduğu süspansiyon pH: 5,0'a ayarlanmıştır. 50 mL kapaklı polipropilen santrifüj tüpüne aktarılan süspansiyon 600g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Yumurtalar dipte çökelti oluşturmuştur. Üst faz dikkatli biçimde yeni tüpe aktarılmış ve 10.000g'de 30 dakika ve 4°C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant jel kılıf içerir.

Yumurtalar yapay deniz suyuna alındığı için yumurta jel kılıfının içinde bulunduğu çözeltinin tuz oranı yüksek olup %3,8 oranındadır. Dolayısıyla bu tuzun uzaklaştırılması amacıyla diyaliz yapılmıştır.

3.2.1.3 Jel kılıfların diyalizi ve liyofilizasyonu

Diyaliz için 2,5 mL ultra saf suda çözülen materyal önceden saf su ile 1,5 dakika hidratize edilen Slide-A-Lyzer 3-12 mL ve MW cut-off 3500 Da diyaliz kasetine (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology) şırınga ile yüklenmiştir. Ardından havası şırınga ile boşaltılan kaset 2L saf su ile 4°C 'de 2 saat manyetik karıştırıcı üzerinde diyaliz edilmiş, su değiştirilip yenilenerek tekrar 4°C 'de 22 saat daha diyaliz edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Kaset diyaliz sistemi. Önceden saf su ile hidratize edilen sisteme şırınga ile örnek yüklenir, havası alınır ve ardından çözeltiliye daldırılır. (www.thermo.com/pierce)

Diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra membran içindeki örnek şırınga ile yeni bir behere aktarılıp dondurulmuş ve ardından 24 saat liyofilizasyon sisteminde bekletilmiştir. Bu basamakta elde edilen protein çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Protein miktarı Bradford (Bradford, 1976) yöntemiyle ölçülmüştür.

3.2.2 Jel kılıf protein/glikoprotein profilinin SDS-PAGE ve lektin blot ile belirlenmesi

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez), Mini-Protean III (Bio-Rad) elektrofrez sistemi kullanılarak yapılmıştır. 1 mm kalınlıktaki cam kaset için alt (resolving-separating) jel % 7,5 üst (stacking) jel % 4 olacak şekilde hazırlanmıştır (Bollag et al., 1996). Ardından polimerleşmesi için 30 dakika bekletilmiştir. Jele yüklenecek örnek çözeltilisi konsantrasyonlarına göre

yükleme tamponu [(Tris-HCl, pH:6.8, gliserol, %10 SDS, % 0.5 bromfenol mavisi, ultra saf su) + beta merkaptotanol] karışımıyla seyreltilmiştir.

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

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 jelin fotoğrafı çekilmiştir.

SDS-PAGE ardından jeldeki **glikoproteinlerin** belirlenmesi için Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama yapılmıştır (Doerner and White, 1990). Poliakrilamid jel fiksasyon solüsyonuyla 1 saat oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Ardından 1 saat oda sıcaklığında eşitleme solüsyonunda bekletilmiştir. 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 jele, 4 °C'de ve karanlıkta, önceden hazırlanmış Schiff bazı solüsyonu ilave edilmiştir. Schiff bazı uygulamasından sonra atık Schiff solüsyonu dökülerek jel % 0,5'lik sodyum metabisülfid ile yıkanıp jel görüntüleme aletiyle (DNR Bio-Imaging System) jelin görüntüsü alınmıştır.

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 daha sonra jele her kuyuda 10 µg olacak şekilde yükleme tamponu ile 1:1 (v/v) seyreltilerek yüklenmiştir.

Lektin blotting sistemiyle sialik asit belirlenmesi amacıyla yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan jel üzerinde bulunan proteinler PVDF membran üzerine transfer edilmiştir. Bunun için 25 amper sabit akım altında gece boyu transfer metodu kullanılmıştır. Transfer sonrası membran %5 BSA ile bloklanmış ve yıkanmıştır. 2µg/mL olacak biçimde hazırlanan HRP ile konjuge olan ticari LFA (*Limax flavus* aglutinin) lektin membran üzerine ilave edilmiştir. Sonrasında TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) ile sialik asitlere tutunan lektinler görünür hale getirilmiştir.

3.2.3 Jel kılıf glikoproteinlerinde monosakkaritlerin belirlenmesi

Standartların Hazırlanması: 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.

Sialik asit analizi için standart olarak kullanılan N-asetil nöraminik asit, Neu5Ac, (Sigma), N-glikolil Nöraminik asit, Neu5Gc, (Sigma) ve deamino nöraminik asit, KDN, (Sigma), ultra saf su içinde 1000 ppm (1 mg/ml) olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışma çözeltileri stok çözeltiden basamaklı seyreltmeler yoluyla hazırlanmıştır.

Bunların yanında analizi standardize edebilmek amacıyla Fetuin (Sigma Aldrich) ve Ovalbumin (Sigma Aldrich) ve BSA (Sigma Aldrich) referans glikoproteinleri ile ilk çalışmalar yapılmıştır.

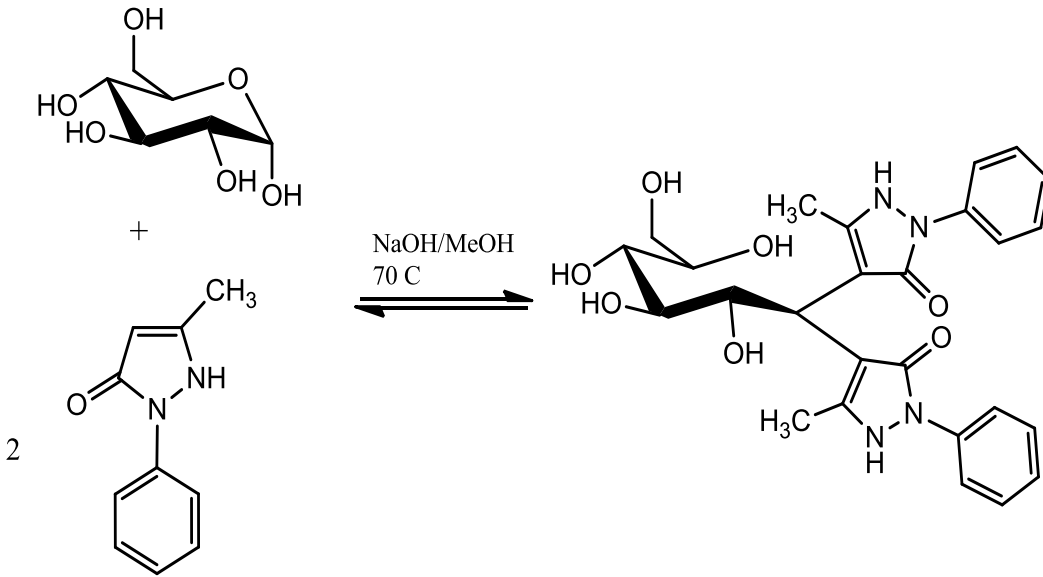
Asit hidrolizi: Yumurta jel kılıfı monosakkarit analizi için öncelikle şekerlerin asit hidrolizi ile serbest bırakılması gerekmektedir. Bu amaçla 1,5 mg örnek 200 µL 4M TFA (trifloroasetik asit) ilave edilerek çözülmüş ve 1,5 mL kilitli kapaklı polipropilen santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Elde edilen çözelti etüv (Binder, ED 53) içinde 100 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Hidroliz edilen yumurta jel kılıfı vakum konsantratörde (Martin Christ, RVC 2-25) 35 °C'de kuruluğa kadar uçurulmuştur. Sialik asitin hidrolizi için 1,5 mg örneğe 200 µL 2M asetik asit ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti 1,5 mL kilitli kapaklı polipropilen

santrifüj tüpüne aktarılmış ve etüvde (Binder, ED 53) 80 °C’de 3 saat inkübe edilmiştir.

Amino grupların N-asetilasyonu: TFA güçlü bir asittir ve glikozidik bağları koparabilir. Bunun yanında asetil gruplarını daha kolay koparabilir. N-asetilglukozamin ve N-asetilgalaktozamin üzerinde azot atomuna bağlı olan bu asetil gruplarının tekrar bağlanabilmesi amacıyla reasetilasyon prosedürü uygulanmıştır. Kuruluğa kadar uçurulan örnekler üzerine 5 µL 25mM pH:9,5 bikarbonat (Horasan Kimya) çözeltisi ilave edilmiş ve vortekslenen çözelti üzerine asetik anhidrit (Sigma Aldrich) çözeltisinden 2 µL ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen bu çözelti vakum konsantratörde (Martin Christ, RVC 2-25) 35 °C’de kuruluğa kadar uçurulmuştur. Sialik asit analizinde bu işlem uygulanmaz.

Monosakkaritlerin türevlendirilmesi

Vakum evaporatörde kuruluğa kadar uçurulan ve yeniden asetillendirilen örneklerin LC-MS sisteminde daha duyarlı analiz edilebilmesi amacıyla flouresan PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, Sigma Aldrich) reaktifi ile türevlendirilmiştir (Şekil 3.6)

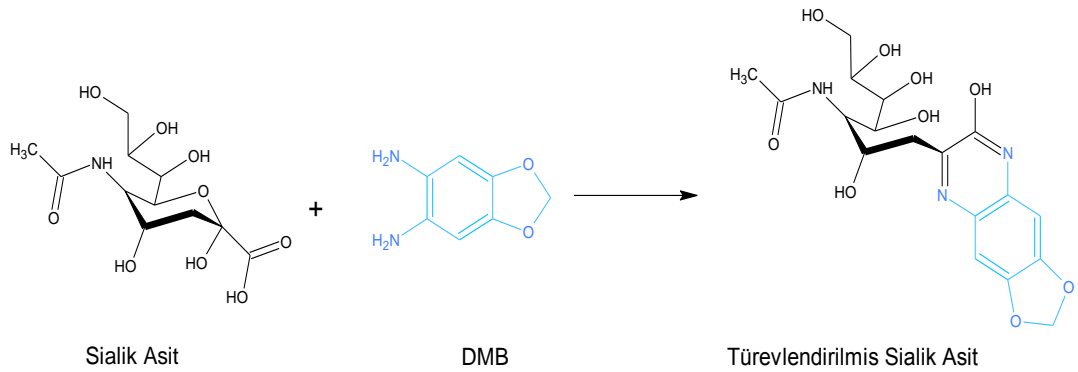


Şekil 3.6: Monosakkaritlerin (sialik asit hariç) PMP ile türevlenme reaksiyonu.

PMP reaktifi metanol içinde 87,1mg/mL (0,5M) olacak biçimde hazırlanmıştır. 50 μ L PMP ve 50 μ L 0,3 M NaOH (Sigma Aldrich) ilave edilen kuru örnek vortekslenmiş ve 0,5 mL kilitli kapaklı polipropilen tüp (Axigen) içinde 70°C’de 1 saat inkübe edilmiştir.

Oda sıcaklığına soğutulan ve türevlendirilmiş monosakkaritlerin bulunduğu çözeltiye 150 μ L 0,1 M HCl (Hidroklorik Asit, Riedel-de Haen) ilave edilerek nötralizasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyona girmeyen fazla PMP’nin uzaklaştırılması için 200 μ L kloroform (Riedel-de Haen) ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Alt fazda bulunan kloroform pipet yardımıyla atılmıştır. Türevlenen monosakkaritler su fazında yer alır. Ekstraksiyon işlemi üç defa tekrarlanmıştır. Son aşamada 3000g’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant CapLC-ESI-MS/MS analizi için viallere aktarılmış ve analiz edilmiştir.

Sialik asitin LC-MS sisteminde daha duyarlı analiz edilebilmesi amacıyla DMB (1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene.2HCl, Sigma Aldrich) flouresan reaktifi ile türevlendirilmiştir (Şekil 3.7)



Şekil 3.7: Sialik asidin DMB ile türevlenme reaksiyonu.

DMB reaktifi 1,55 mg/mL (7mM) olacak biçimde tartılmıştır. 3,68 mg sodyumhidrosülfid (Acros Organics) de ilave edildikten sonra 950 μ L 1,4M asetik asit içinde çözülüp ve 50 μ L 2-merkптоetanol (sigma) ilave edilmiştir. İyice vortekslenen çözelti ışıktan korunur ve +4 °C’de saklanmıştır.

Sialik asit standartları karışım halinde 1 μ g/mL olacak biçimde hazırlanmıştır. Bu çözelti hidroliz edilmeden doğrudan DMB çözeltisinden 40 μ L ilave edilerek türevlendirilmiştir. Hidroliz edilen örnekten 40 μ L alınmış ve üzerine 40 μ L DMB

çözeltisi ilave edilerek 0,5 mL kilitli kapaklı polipropilen tüp (Axigen) içinde 60°C'de 2,5 saat inkübe edilerek türevlendirilmiştir.

Monosakkarit analizinde HPLC: Türevlendirilen monosakkaritlerin analizinde ters-faz kromatografi kullanılmıştır. Agilent 1200 Capillary HPLC (Polo alto, USA) sisteminde (ACE 5 C18 150 x 0,5 mm 5 µm) ters faz kolon kullanılarak kromatografik ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Mobil faz asetonitril (Sigma Aldrich) ve ultra saf su ikilisinden oluşur. Tüm bileşenlerin kolonda ayrımını sağlayabilmek amacıyla gradient elüsyon yapılmıştır. Yüksek performans gradient elde edebilmek amacıyla 1. dakika sonunda divert valf direkt konuma alınmıştır. Mobil faz akış hızı 20 µL/dak. ve enjeksiyon hacmi 0,1 µL olarak belirlenmiştir. Her enjeksiyondan sonra iğnenin yıkanması amacıyla yıkama programı uygulanmıştır. Analiz edilecek numuneler soğutmalı otoörnekleyicide 5°C'de bekletilerek analiz edilmiştir. Toplam analiz süresi 60 dakikadır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2: Monosakkarit analiz gradient tablosu

Zaman (dakika)	% Asetonitril (ACN)
0	15
1	15
10	17
30	20
55	25
56	60
57	60
58	15

Sialik asit analizinde HPLC: Sialik asit analizinde ters-faz kromatografi kullanılmıştır. Agilent 1200 Capillary HPLC (Polo alto, USA) sisteminde (ACE 5 C18 150 x 0,5 mm 5 µm) ters faz kolon kullanılarak kromatografik ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Mobil faz asetonitril-metanol (Sigma Aldrich) karışımı (2:3) ve ultra saf su ikilisinden oluşur. Tüm bileşenlerin kolonda ayrımını sağlayabilmek amacıyla gradient elüsyon yapılmıştır. Yüksek performans gradient elde edebilmek amacıyla 30. dakika sonunda divert valf direkt konuma alınmıştır. Mobil faz akış hızı 20 µL/dak. ve enjeksiyon hacmi 0,5 µL olarak belirlenmiştir.

Her enjeksiyondan sonra iğnenin yıkanması amacıyla yıkama programı uygulanmıştır. Analiz edilecek numuneler soğutmalı otoörnekleyicide 5°C’de bekletilerek analiz edilmiştir. Toplam analiz süresi 55 dakikadır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3: Sialik asit analiz gradient tablosu

Zaman (dakika)	% ACN-MeOH
0	12,5
30	12,5
30,5	50
40	50
40,5	12,5
55	12,5

Ion Trap ESI MS/MS: Kolon sonrası kütle dedeksiyonu Bruker HCT Ultra Ion Trap LC-MSⁿ (Bremen, Germany) ile yapılmıştır. Sistem iyon optik voltajları smart tune kullanılarak tayin edilmiştir. Analiz pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir ve Çizelge 3.4’te gösterilen değerlerde analiz yapılmıştır.

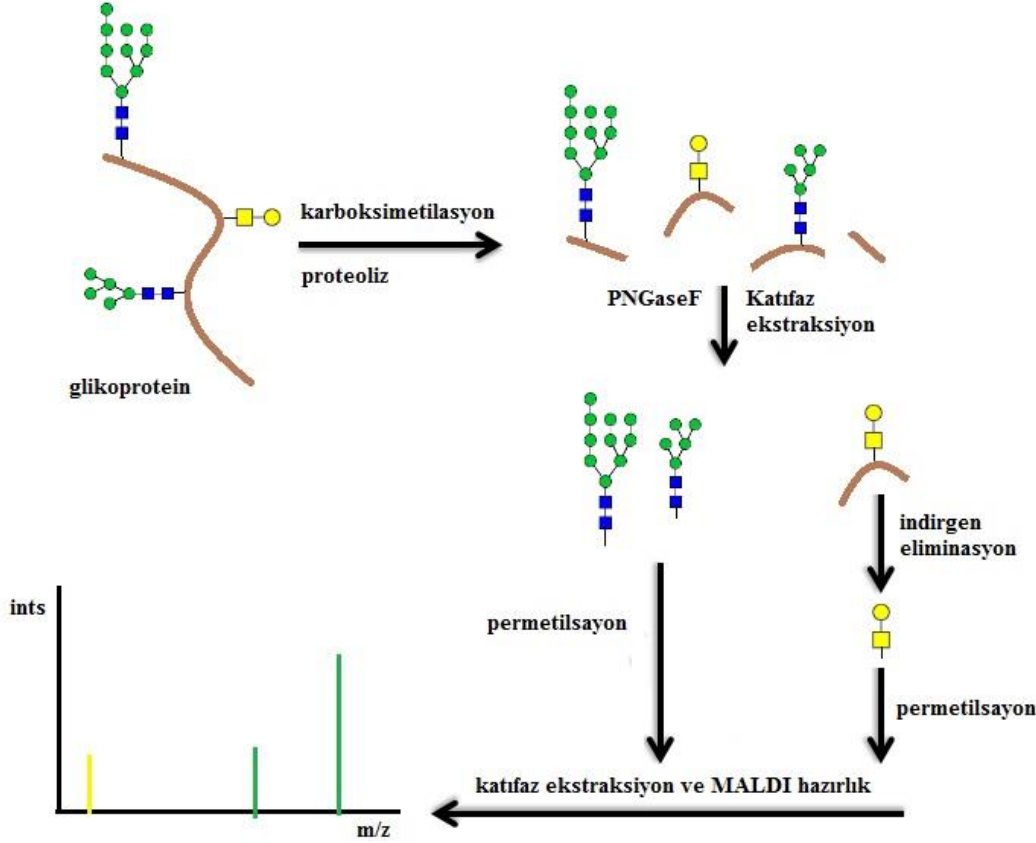
Çizelge 3.4: Monosakkarit analizi için kütle spektrometresi değerleri tablosu

MS parametreleri	Değerler
Mass Range Mode	Ultra Scan
Ion Polarity	Positive
Ion source Type	ESI
HV capillary	-4000 V
Dry Temp	300 °C
Nebulizer	25 psi
Dry Gas	6 L/min
Rolling	on
ICC	on

3.2.4 N- ve O- glikanların glikomik yaklaşımla belirlenmesi

Yumurta jel kılıfında N-Glikan örnek hazırlama aşaması ve MALDI-TOF analizi Imperial College of London’da Prof.Dr. Anne DELL laboratuvarlarında (Centre for Integrative Systems Biology and Bioinformatics (CISBIO core

facilities), Biopolymer Mass Spectrometry Laboratory in the Sir Ernst Chain Building Wolfson Laboratories, SK Campus) yapılmıştır. N-glikan ve O-Glikan analizi Şekil 3.8’de özetle gösterilen biçimde yapılmıştır.



Şekil 3.8: N-Glikan ve O-Glikan analizinde örnek hazırlama prosedürü şematik gösterimi (Yeşil-mavi: N-Glikanlar; Sarı: O-glikanlar).

Glikoproteinlerin karboksimetilasyonu ve indirgenmesi: 0,80 mg yumurta jel kılıfı proteini 1 mL DTT (2 mg DTT 1 mL 0,6M Tris içinde) çözülmüştür. 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiş, edilen örneğe 1 mL (12µg/mL) iyodoasetikasit (IAA) ilave edilmiştir. Ardından vortekslenmiş ve 90 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra çözelti 2 cm uzunluğunda diyaliz tüpüne (Thermo Sanke Skin MW cut-off: 7000 Da) aktarılmış ve 4,5 L 50mM amonyum bikarbonat çözeltisinde 4 °C’de 24 saat manyetik karıştırıcı eşliğinde diyaliz edilmiştir. Diyalizin ardından örnek cam tüpe aktarılmış, diyaliz tüpü bir miktar su ile çalkalanmış ve yine cam tüpteki çözeltiye ilave edilmiştir. Örnek hacmi 1 mL hacme ulaşınca kadar vakum konsantratörde deriştirilmiş ve ardından liyofilize edilmiştir.

Glikoproteinlerin tripsin ile parçalanması: 1 µg/µL tripsin 0,05 M amonyum bikarbonat kullanılarak hazırlanmış ve 300 µL liyofilize edilen örnek üzerine eklenmiş, vortekslenmiştir ve 37 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Tripsin etkinliğini durdurmak için 100 °C'de 2 dakika bekletilmiş ve %5 asetik asitten 3 damla ilave edilmiştir. Oluşan peptitleri saflaştırabilmek amacıyla OASIS HLB plus (Waters, 186000132) katı faz ekstraksiyon yapılmış ve ardından elüsyon liyofilize edilmiştir.

Glikanların glikopeptitlerden koparılması: Liyofilizatörden alınan örnek üzerine 50 mM 150 µL pH:8,4 olan amonyum bikarbonat tamponundan ilave edilmiştir. Bunun üzerine 5µL PNGaseF (REF 11 365 177 001 ROCHE) ilave edilmiştir. Enzim ilave edildikten sonra 37 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnek liyofilize edilmiş ve ardından SEP-PAK C18 (Waters, wat051910) katıfaz ekstraksiyon sisteminde saflaştırma yapılmıştır. Metanol ile şartlandırılan kolona %5 asetik asit içinde çözülen örnek yüklenmiştir. N-glikanları ayırabilmek için 5 mL %5 asetik asit ile elüsyon yapılmıştır. Daha sonra 4 mL % 5 asetik asit içinde %20 propan-1-ol 2. tüpe ve 4 mL % 5 asetik asit içinde %40 propan-1-ol 3. tüpe son olarak %100 propan-1-ol ile 4.tüpe elüsyon yapılmıştır. Vakum konsantratörde propan-ol ve asetik asit uçurulup ardından liyofilize edilmiştir. N-glikan fraksiyonu %5 asetik asit ile elüe edilen tüpte yer alırken O-glikopeptitler ise %100 propan-1-ol fraksiyonunda bulunmaktadır. Liyofilize edilen bu örneklerden N-glikanlar permetilasyon işleminin ardından analiz edilebilir hale gelecektir. Fakat O-glikanları peptitlerden koparabilmek için kimyasal yöntem ile indirgen ayrılması (reductive elimination) gerekmektedir.

İndirgen ayrılması (reductive elimination): O-glikanların peptitlerden koparılması amacıyla 55 mg KBH₄ (Sigma) 1mL 0,1 KOH içine ilave edilmiş, bu çözeltiden 400 µL yukarıda liyofilize edilen %100 propan-1-ol fraksiyonuna ilave edilmiş ve 45 °C'de 14-16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu tamamlanan örneğe saf asetik asitten 4-5 damla ilave edilerek nötralizasyon sağlanmıştır. Bu işlem çok yavaş ve dikkatli biçimde buhar-dumanımsı yapı yok oluncaya kadar yapılır. Pastör pipet ucuna cam yün takılmış ve Dowex desalting dolgusu bu pastör pipet içine doldurulmuştur. O-glikan örnekleri bu kolondan geçirilerek tuzlarından arındırılmıştır. %5 asetik asitle elüe edilen O-glikan yapıları vakum konsantratörde uçurulup liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen O-glikan

fraksiyonu içinde beyaz toz halinde epeyce bor tuzu bulunur. Bunu evaporasyonla uzaklaştırmak için %10 metanolik asetik asit kullanılır. 4 x 0,5 mL ile azot altında ve oda sıcaklığında uçurulup ardından permetilasyon işlemi yapılmıştır.

Permetilasyon: Cam havan içinde 3 pellet NaOH iyice ezilip 3mL DMSO ilave edilmiştir. Sodyum hidroksit DMSO içinde çözünmez. Elde edilen eyaz karışımdan toz parçacıkları da olacak biçimde örnek üzerine 0,5 – 1,0 mL ilave edilmiştir. Ardından 600 µL metil iyodür ve sonra 1 mL DMSO ilave edilmiştir. Örnek süt gibi beyaz olana kadar 20 dakika çalkalayıcıda karıştırılmış sonunda reaksiyonu durdurmak için dikkatlice ve damla halinde su ilave edilmiştir. Bu sırada ekzotermik reaksiyon gözlenir sıcaklık çıkışı olur. Baloncuk çıkışı duruncaya kadar su eklenmiş böylece yaklaşık 5 mL su ilave edilmiştir. Permetilasyon sonucu oluşan şekerler kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Kloroform fazında şekerler bulunur. Ekstraksiyon üç defa tekrarlanmış ve son aşamada kloroform fazı azot altında uçurulmuştur. Son olarak permetillenmiş örnekler için Sep-Pak C18 katı faz ekstraksiyon sisteminde ön temizleme yapılmıştır. Metanol, su ve asetonitril ile şartlandırılan kolondan 200 µL 1:1 metanol:su içinde çözünen örnek geçirilmiştir. Ardından %35, %50 ve %75 asetonitril elüsyon fraksiyonları ayrı ayrı toplanmış ve vakum konsantratörde uçurulup ve liyofilize edilmiştir.

Türevlenen N- ve O-Glikanların MALDI-TOF analizi için hazırlanması: DHB matriks hazırlamak için 20 mg DHB 1,5 mL kapaklı santrifüj tüpüne tartılmıştır. Üzerine 300 µL su ve 700 µL metanol ilave edilmiştir. Liyofilize edilen türevlendirilmiş glikanlar üzerine 10 µL metanol ilave edilip çözünmesi sağlanmıştır. Ardından 1 µL DHB çözeltisi ve 1 µL glikan çözeltisi karıştırılmış ve 1 µL MALDI target üzerine tam olarak dairenin ortasına damlatılmış ve kuruması sağlanmıştır. AB Sciex Voyager MALDI-TOF-MS ile N₂ lazer eşliğinde N ve O-glikan zincirlerinin analizleri yapılmıştır. Bu sistemde MS/MS parçalanma özelliği bulunmadığından glikanların parçalanma iyonları elde edilmemiştir. N-Glikanların parçalanma iyonlarını karakterize ederek oligosakkarit yapısını daha doğru ortaya çıkarmak ve doğrulamak amacıyla MALDI-TOF analizi için hazırlanan örnekler 100 µL metanol-su karışımında çözülüp LC-MS sistemine enjekte edilmiştir. %35 ACN fraksiyonundan elde edilen permetillenmiş N-glikanlara ait MALDI-TOF sisteminde tespit edilmiş

olan iyonlardan m/z 1784, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, m/z 1988, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, m/z 2192, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, m/z 2396, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosakkaritleri LC-MS/MS sisteminde yüksek verimle analiz edilmiş ve parçalanma iyonları karakterize edilmiştir.

O-Glikanların PMP türevlenme yöntemiyle analizi: Imperial College of London'da Prof.Dr. Anne DELL laboratuvarlarında MALDI-TOF kütle spektrometresiyle yapılan O-Glikan analizinin yanında laboratuvarlarımız koşullarında modifiye edilmiş yeni bir yöntemle de yumurta jel kılıfında O-Glikan analizi yapılmıştır.

Yumurta jel kılıfının PMP ile O-glikan analizi için hazırlanması: Bu çalışmada fetuin standart olarak kullanılmıştır. 2,4 mg fetuin üzerine %25 amonyak çözeltisinden 200 μL doğrudan ilave edilmiştir. Ardından metanolde hazırlanan 200 μL 0,5 M PMP türevlendirici reaktifi ilave edilmiştir. 3,9 mg yumurta jel kılıfı izolatu üzerine %25 amonyak çözeltisinden 200 μL ve 0,5 M PMP türevlendirici reaktifinden de 200 μL ilave edilmiş ve 50 °C'de kilitli kapaklı 1,5 mL santrifüj tüpünde 12 saat inkübe edilmiştir. Vakum konsantratörde kurutulan örnekler 500 μL suda çözülmüş 25 μL glasiyel asetik asit ilave edilmiştir. 500 μL diklorometan ile 3 defa ekstrakte edilip son aşamada santrifüj yapılarak faz ayrımı sağlanmıştır. Su fazı (üst) yeni bir tüpe aktarılıp 10 μL %13 amonyak ilave edilmiş, vakum evaporatörde uçurularak kurutulmuş ve ardından 1 mL saf suda çözülmüştür. Ön deriştirme ve saflaştırma amacıyla C18 katı faz ekstraksiyon kartuşu (Macharey-Nagel) kullanılmıştır. 3 mL asetonitril ve ardından 3 mL ultra saf su ile şartlandırılan kartuşa örnek yüklenmiş ve 0,4 mL su ile kartuş yıkanmıştır. 2:7 ACN:su karışımından 3 mL ile elüsyon yapılmış ve azot altında uçurulmuştur. 150 μL 1:1 metanol:su karışımı ile çözümlenip LC-MS sistemine enjekte edilmek üzere 0,22 μm filtreden geçirilerek vial insert aparatına aktarılmıştır.

HPLC parametreleri: PMP ile türevlendirilen O-Glikanlar, Agilent 1200 Capillary HPLC (Polo alto, USA) sisteminde (ACE 5 C18 150 x 0,5 mm 5 μm) ters faz kolon kullanılarak analiz edilmiştir. Mobil faz asetonitril (Sigma Aldrich) ve ultra saf su ikilisinden oluşur. Tüm bileşenlerin kolonda ayrımını sağlayabilmek amacıyla gradient elüsyon yapılmıştır. Yüksek performans gradient elde edebilmek amacıyla 30. dakika sonunda divert valf direkt konuma alınmıştır.

Mobil faz akış hızı 20 $\mu\text{L}/\text{dak.}$ ve enjeksiyon hacmi 0,5 μL olarak belirlenmiştir. Her enjeksiyondan sonra iğnenin yıkanması amacıyla yıkama programı uygulanmıştır. Analiz edilecek numuneler soğutmalı oto-örnekleyicide 5°C'de bekletilerek analiz edilmiştir. Toplam analiz süresi 55 dakikadır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5: O-glikanların analizinde gradient tablosu

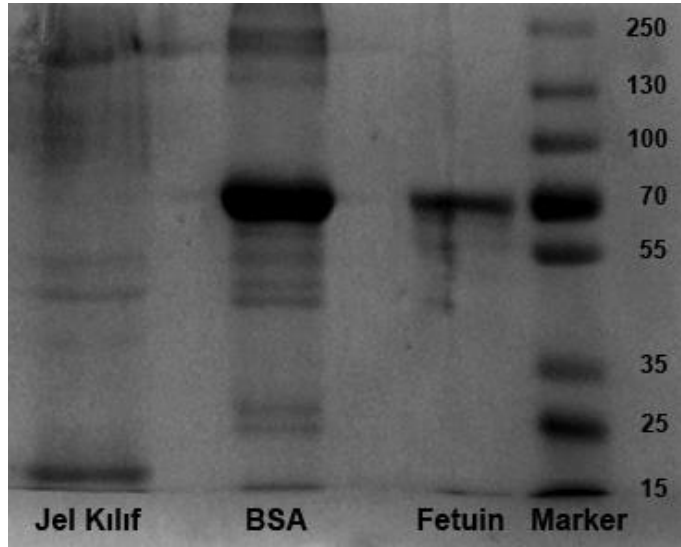
Zaman (dakika)	% Asetonitril (ACN)
0	15
1	15
10	17
30	20
55	25
56	60
57	60
58	15

Ion Trap ESI MS/MS: Kolon sonrası kütle analiz Bruker HCT Ultra Ion Trap LC-MSⁿ (Bremen, Germany) ile yapılmıştır. Sistem iyon optik voltajları smart tune kullanılarak tayin edilmiştir. Analiz pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Bu analizin yapılabilmesi için iki MS tekniği kullanılmıştır. İlk önce bilinmeyen kütlelerin tespit edilebilmesi amacıyla kolona enjekte edilen tüm molekülleri tarayan Auto(MS)ⁿ tekniği kullanılmıştır. Bu teknik ile 55 dakika gradient sistem ile kolonda ayrımı gerçekleştirilen bileşenlerin aynı zaman diliminde hem MS hem de MS/MS parçalanma iyonları kaydedilebilmektedir. Karmaşık ve bilinmeyen analizlerde başarı ile kullanılabilen bu programlama ile LC-MS sisteminden yüksek performans alınabilmektedir. Auto(MS)ⁿ tekniği ile MS² koşulu ve diğer parametreler yazıldığında elde edilen spektrumlar tek tek manuel olarak gözden geçirilmiş ve O-Glikan olasılığı taşıyan iyonlar normal modda tekrar analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

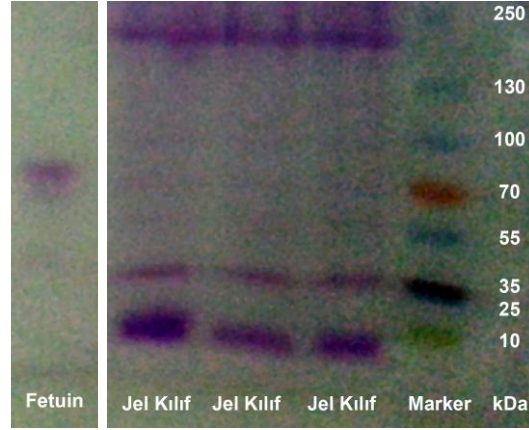
4.1 Jel Kılıf Protein/Glikoprotein Profilinein SDS-PAGE ve Lektin Blotlama ile Karakterizasyonu

P. lividus yumurta jel kılıfının öncelikle protein profilinein ortaya konması için yapılan **SDS-PAGE** ile analiz sonucu, ~250 kDa'da belirgin bir bant, ~55 kDa ve 50 kDa'da oldukça zayıf iki bant ve 15 kDa civarında belirgin bir bant ayırt edilmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca, glikozillenmemiş bir protein olan BSA ile bir glikoprotein olan Fetuin de çalışmada kontrol amacıyla kullanılmıştır. Her ikisinde de 70 kDa civarında çok yoğun bir bant ile BSA'da çok sayıda zayıf bant görülmüştür (Şekil 4.1).



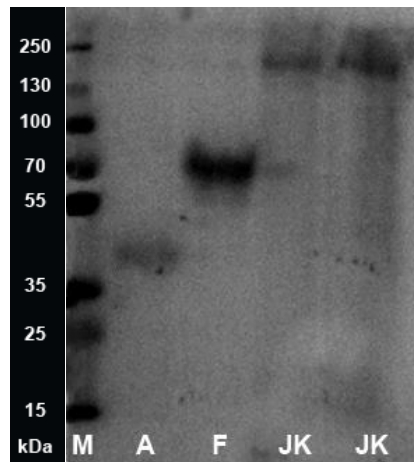
Şekil 4.1: Yumurta jel kılıfı ile kontrol amaçlı kullanılan BSA ve Fetuinin SDS-PAGE jeldeki protein bantları (Jel akrilamid miktarı: %7,5; boyama: commasie mavisi).

Jel kılıfta belirlenen bu proteinlerden hangilerinin glikozillenmiş (glikoprotein ve/veya proteoglikan) olduğunu belirlemek için yapılan Periyodik Asit-Schiff (**PAS**) boyama ile yoğun boyanmış üç bant ayırt edilmiştir. Bu bantlar ~250 kDa, ~35 kDa ve ~10 kDa boyutundadır (Şekil 4.2). Fetuin glikoproteinini de kontrol olarak kullanılmış ve 70 kDa'da pozitif bir bant elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Jel kılıfa ait glikozillenmiş protein (glikoprotein ve/veya proteoglikan) bantları ve kontrol amaçlı kullanılan fetuin glikoproteinini bandı (SDS-PAGE Jel, PAS boyama).

PAS boyama ile yoğun boyanan bu üç glikozillenmiş proteinden glikoprotein olanları, proteoglikanlardan ayırabilmek için **lektin blotlama** yapılmıştır. Bunun için proteoglikanlarda bulunmayıp glikoproteinlere özgü olan ve glikan zincirlerinin genelde uç molekülü olan sialik asidi belirlemek amacıyla ona spesifik olarak bağlanan bir lektin (LFA) tercih edilmiştir. LFA lektin tüm sialik asit bağ tiplerini ve bütün asetil modifikasyonlarını da kapsayan tanıma özelliğine sahiptir. Blotlama sonrası elde edilen görüntüde sialik asitlerin daha çok 250 kDa civarındaki büyük proteinde bol bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.3). PAS ile boyanmış olan ~35 kDa ve ~10 kDa boyutlarındaki daha küçük proteinler LFA lektin ile işaretlenmemişlerdir. Pozitif kontrol için üzerinde bol sialik asit taşıdığı bilinen ticari fetuin ile tavuk albümini kullanılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: TMB ile reaksiyon sonrası görünür olan LFA lektin blotlama. M. marker; A: tavuk albümini; F: fetuin; JK: jel kılıf.

4.2 Jel Kılıf Glikoproteinlerinde Monosakkaritler

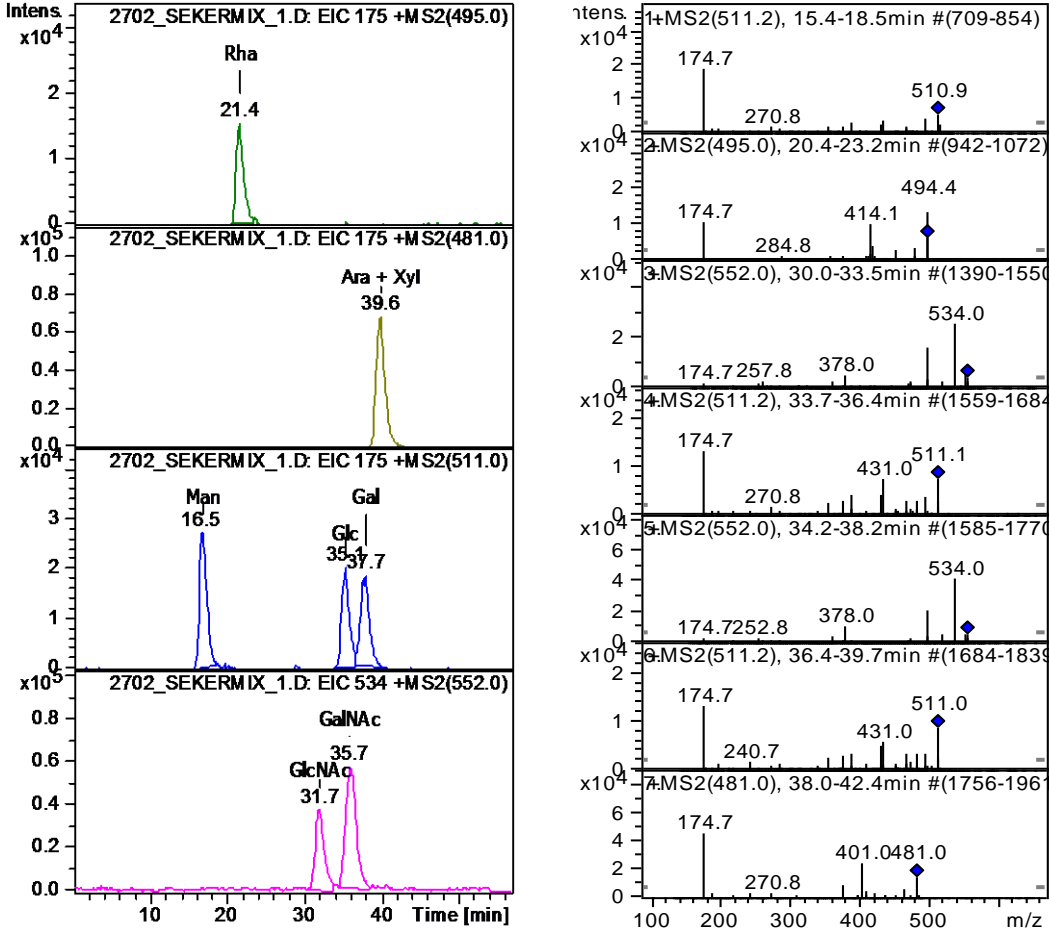
Monosakkarit analizleri yayınlanmış bazı prosedürlerin (Harazono et al., 2011; McRae and Monreal, 2011) kısmen yeniden yorumlanması sonucunda elde edilen yeni yöntemle yapılmıştır.

PMP-monosakkarit türevi ile meydana gelen moleküler yapının MS/MS parçalanma iyonlarının çoklu çalışılabilmesi amacıyla MRM (multiple reaction monitoring) sistem kullanılarak kromatogram ve spektrumlar elde edilmiştir. Standart olarak kullanılan monosakkaritlerin her biri tek tek LC-MS/MS sistemine enjekte edilerek ana iyonlar ve parçalanma iyonları karakterize edilmiştir. Standart olarak kullanılan bu monosakkaritlerin PMP türevlerine ait ana iyonlar ve alıkonma zamanları Çizelge 4.1'de kromatogram ve spektrumları Şekil 4.4'de verilmiştir).

Çizelge 4.1: Monosakkarit alıkonma süreleri, ana iyon ve parçalanma iyonları. MRM kromatogramlarının oluşturulmasında kullanılan parçalanma iyonları koyu yazılmıştır

Monosakkarit	Alıkonma Süresi(dak)	Ana iyon [M+H] ⁺	Parçalanma İyonları
Mannoz	15,3	511	175-271-373
Ramnoz	18,8	495	175-285-373-477
N-asetilGlukozamin	30,0	552	175-253-378- 534
Glukoz	33,1	511	175-271-373
N-asetilGalaktozamin	33,8	552	175-253-378- 534
Galaktoz	35,6	511	175-271-373
Arabinoz+Ksiloz	37,6	481	175-271-373

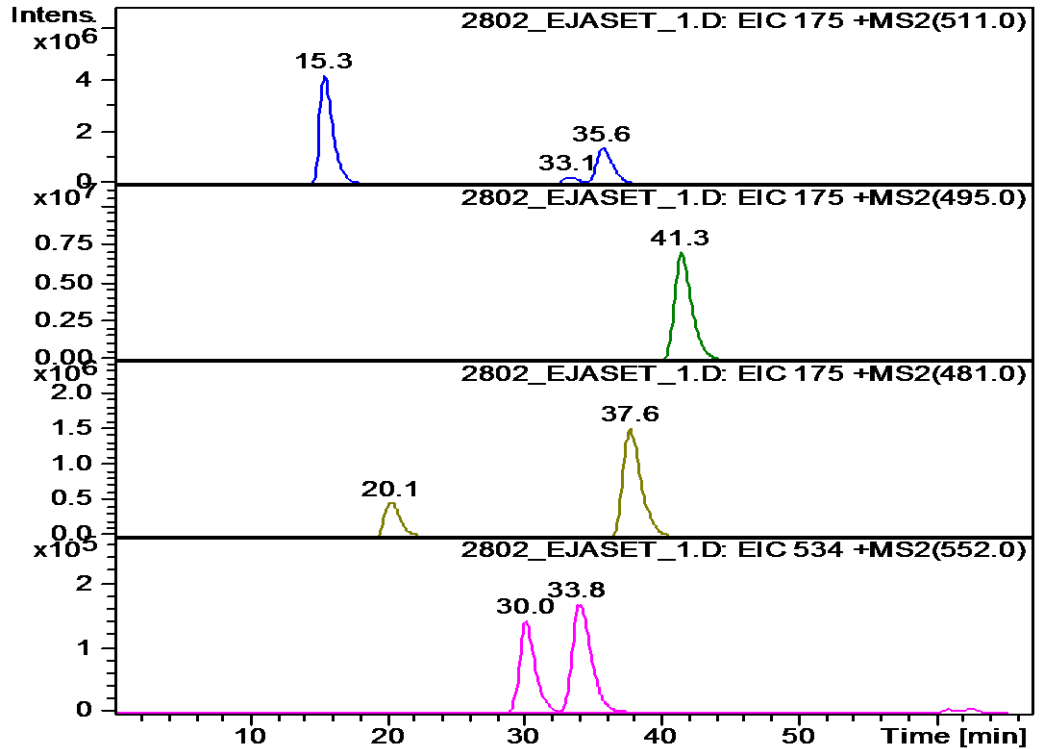
Aynı kapalı molekül formülüne sahip ve polariteleri de oldukça yakın olan mannoz, glikoz ve galaktoz PMP türevlendirme ile, yüksek çözünürlükle birbirlerinden ayrılmıştır. Ayrıca çok daha düşük konsantrasyonlarda (LOQ: 1 ng/mL) analiz imkânı sunmaktadır. Türevlendirici reaktifin (PMP) aşırı miktarda reaksiyona ilave edilmesi, sonrasında reaksiyona girmeyen kısmın sıvı-sıvı ekstraksiyon ile uzaklaştırılması da başarıyla gerçekleştirildiği için kromatogramda ve analizde herhangi bir girişim yapmamıştır.



Şekil 4. 4: Monosakarit standartları MRM kromatogram ve spektrumları.

Bis-PMP türevlerinin (iki PMP molekülü eklentili monosakarit) protonlanmış pseudo moleküler iyonları ana iyon olarak ele alınmıştır. Ana iyon $[M+H]^+$, parçalanma iyonları ve alıkonma sürelerine göre; iki PMP molekülü ile sübstitüye olan monosakaritlerden mannoz, glukoz ve galaktoz protonlanmış ana iyonları m/z değeri 511 olup MRM sonucu elde edilen en yüksek sinyal değerine sahip parçalanma iyonu m/z 175'tir. Diğer şekerlerin de ana iyonları ve parçalanma iyonları aynı olmasına rağmen ayrımları polarite farkından dolayı sağlanabilmiştir. Benzer biçimde GalNAc ve GlcNAc ana iyonları m/z değeri 552 olup parçalanma iyonlarından en yüksek sinyal değerine sahip olan m/z 534 MRM kromatogramında kullanılmıştır. Ramnoz ve fukoz için m/z 495 ana iyon olup yine m/z 175 parçalanma iyonu olarak bulunmuştur. Arabinoz, ksiloz ve riboz için de ana iyon m/z değeri 481 ve parçalanma iyon m/z değeri 175 bulunmuştur. Parçalanma iyonları çizelgede koyu renk ile ifade edilen iyonların dışında kalanlar da doğrulama amaçlı kullanılabilir (bkz. Çizelge 4.1).

Jel kılıfın monosakkaritlerini belirlemeye yönelik olarak; asit hidrolizi sonrasında PMP ile türevlendirilmesi ve LC-MS/MS sisteminde analizi sonucu elde edilen MRM kromatogramları (Şekil 4.5) ve pik alanları (Çizelge 4.2) değerlendirmelerine göre; glukoz, galaktoz ve mannoz için m/z 511 iyonundan elde edilen m/z 175 parçalanma iyonu gözlenmiş ve kromatogramı çizilmiştir. Yeniden asetillendirme sonrası m/z 552 iyonundan elde edilen m/z 534 parçalanma iyonu ile GalNAc ve GlcNAc monosakkaritlerine ait kromatogram elde edilmiştir. Standart monosakkarit karışımı içinde olmayan fakat ana iyon ve parçalanma iyonları literatürde belirtilen riboz ve fukoz (m/z 495) da rahatlıkla tespit edilebilmiştir. Arabinoz ve ksiloz ayrımı gerçekleştirilememiş ve beraber değerlendirilmiştir. PMP türevlendirme sistemiyle izobarik moleküllerin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Dolayısıyla Riboz, arabinoz+ksiloz ikilisinden ayrı pik vermiş ve değerlendirilmiştir. Aynı kütleye sahip olan, izobarik, ramnoz ve fukoz birbirinden ayrılmıştır. N-asetilglukozamin ve N-asetilgalaktozamin birbirinden ayrılmıştır. Temel monosakkarit yapılardan olan mannoz, glukoz ve galaktoz birbirinden ayrılmıştır.



Şekil 4.5: Yumurta jel kılıfı monosakkaritleri MRM kromatogramları.

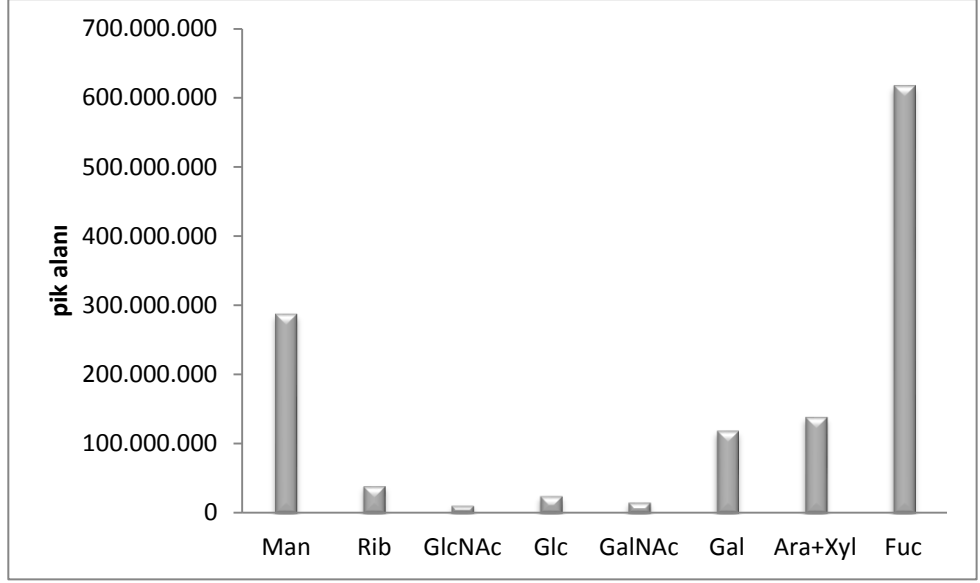
Çizelge 4.2: Yumurta jel kılıfı Monosakkaritleri MRM analizi ve pik alanları.

Monosakkarit	Ana iyon [M+H] ⁺ ve Parçalanma İyonları	Pik Alanları
Mannoz	511>>175	287913804
Riboz	481>>175	39800771
N-asetilGlukozamin	552>>534	11525541
Glukoz	511>>175	25199291
N-asetilGalaktozamin	552>>534	16151106
Galaktoz	511>>175	119383852
Arabinoz+Ksiloz	481>>175	139364122
Fukoz	495>>175	617697877

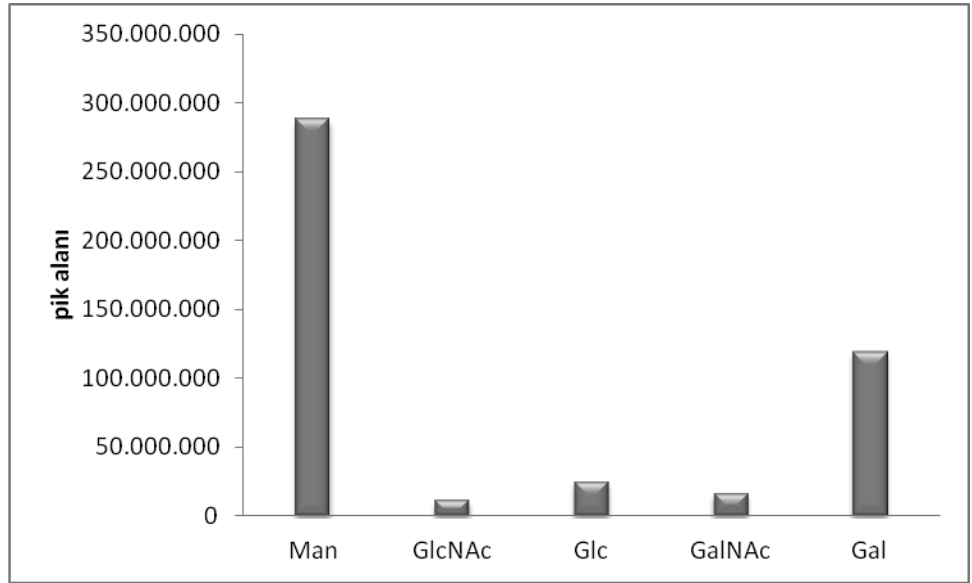
Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de LC-MS/MS sistemi ile elde edilen piklerin alanları ile yumurta jel kılıfından elde edilen monosakkaritleri ilişkilendiren grafik gösterilmiştir. Bu pik alanları monosakkaritlerin konsantrasyonları ile orantılıdır. Buna göre yumurta jel kılıfında en fazla miktarda ölçülen şekerin fukoz olduğu bulunmuştur. Bunun yanısıra mannoz ve arabinoz+ksiloz ikilisi ve galaktoz yoğun miktarda görülmektedir.

Heksoz ve heksozaminler glikoproteinlerde oligosakkarit yapılarında yer aldıkları için fonksiyonel niteliklerinden dolayı ayrı bir grafikte ele alınmıştır. Şekil 4.7’de bu karşılaştırmada mannoz ve ardından galaktoz açık ara yüksek miktarda iken GalNAc, GlcNAc ve Glc bu iki monosakkarite göre oldukça düşük miktarda olduğu görülmektedir.

N-glikanların en az üç molekül mannoz içerdiği bilinmektedir. Yüksek miktarda mannoz varlığı yüksek mannoz tip N-glikanlara işaret edebilir. Dolayısıyla yüksek mannoz N-glikan yapısının yumurta jel kılıfında esas yapı olduğu söylenebilir. Aminoasit dizisi ortaya çıkarılırsa glikozilasyonun olabileceği yerler de tahmin edilerek bir başka açıdan da yaklaşılabilir. Yoğun galaktoz varlığı O-glikanlar için işaret olabilmekle beraber musin benzeri proteinlere ve ya proteoglikan yapısına da işaret edebilmektedir.



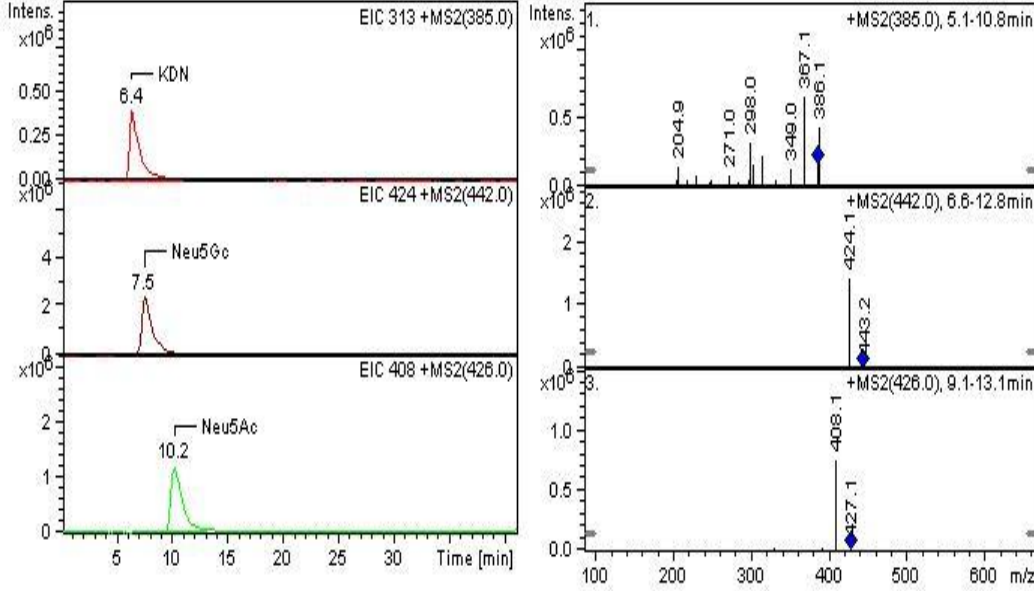
Şekil 4.6: Yumurta jel kılıfı tüm monosakkaritlerin dağılımı (Sialik asit hariç).



Şekil 4.7: Yumurta jel kılıfı heksoz ve heksozamin dağılımı Monosakkaritlerin dağılımı.

Sialik asitlerin analizi için de yayınlanmış çalışmalar (Hara et al., 1989; Klein et al., 1997) optimize edilerek yumurta jel kılıfı glikokonjugatlarında asit hidroliz ve DMB türevlendirme sonrası LC-MS/MS ile sialik asit analizi yapılmış ve O-asetilli sialik asit tipleri belirlenmiştir.

Şekil 4.8’de standart Neu5Ac, Neu5Gc ve KDN tip sialik asitlerin DMB ile türevlendirilip LC-MS/MS ile analizi sonucu elde edilen kromatogram ve spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.8: Sialik asit standartları DMB türevlerinin MRM kromatogram ve spektrumları.

Hidroliz edilmeden türevlendirilen standartlardan, Neu5Ac için m/z 426 ($[M+H]^+$), Neu5Gc için m/z 442 ($[M+H]^+$) ve KDN için m/z 385 ($[M+H]^+$) değerinde ana iyon (pseudo moleküler iyon) olduğu gözlenmiştir. Belirlenen bu ana iyonlar MS/MS sisteminde analiz edilmek üzere CID fragmentlerinin oluşturulması amacıyla MRM sisteminde çalışılmıştır. Buna göre Neu5Ac için m/z 408 değerinde majör parçalanma iyonu elde edilmişken, Neu5Gc için m/z 424 ve KDN için m/z 367 elde edilmiştir.

MS/MS parçalanma iyonları içinde en belirgin iyon pikinin ana molekülden 1 mol su çıkışıyla şekillenen iyonlar $[M-18]^+$ olduğu tespit edilmiştir (bkz Şekil 4.8). Türevlendirilmiş sialik asitler için bu biçimde parçalanmanın görüldüğü iyonlar elde edilir fakat bu durum analizin performansını etkilemez.

Standart sialik asitler ile Neu5Ac, Neu5Gc ve KDN molekülleri DMB türevleri MS sisteminde analiz edilmiş ve HPLC analitik kolonda alıkonma süreleri de belirlenmiştir. Bunun dışında kalan sialik asitler ise ticari olarak

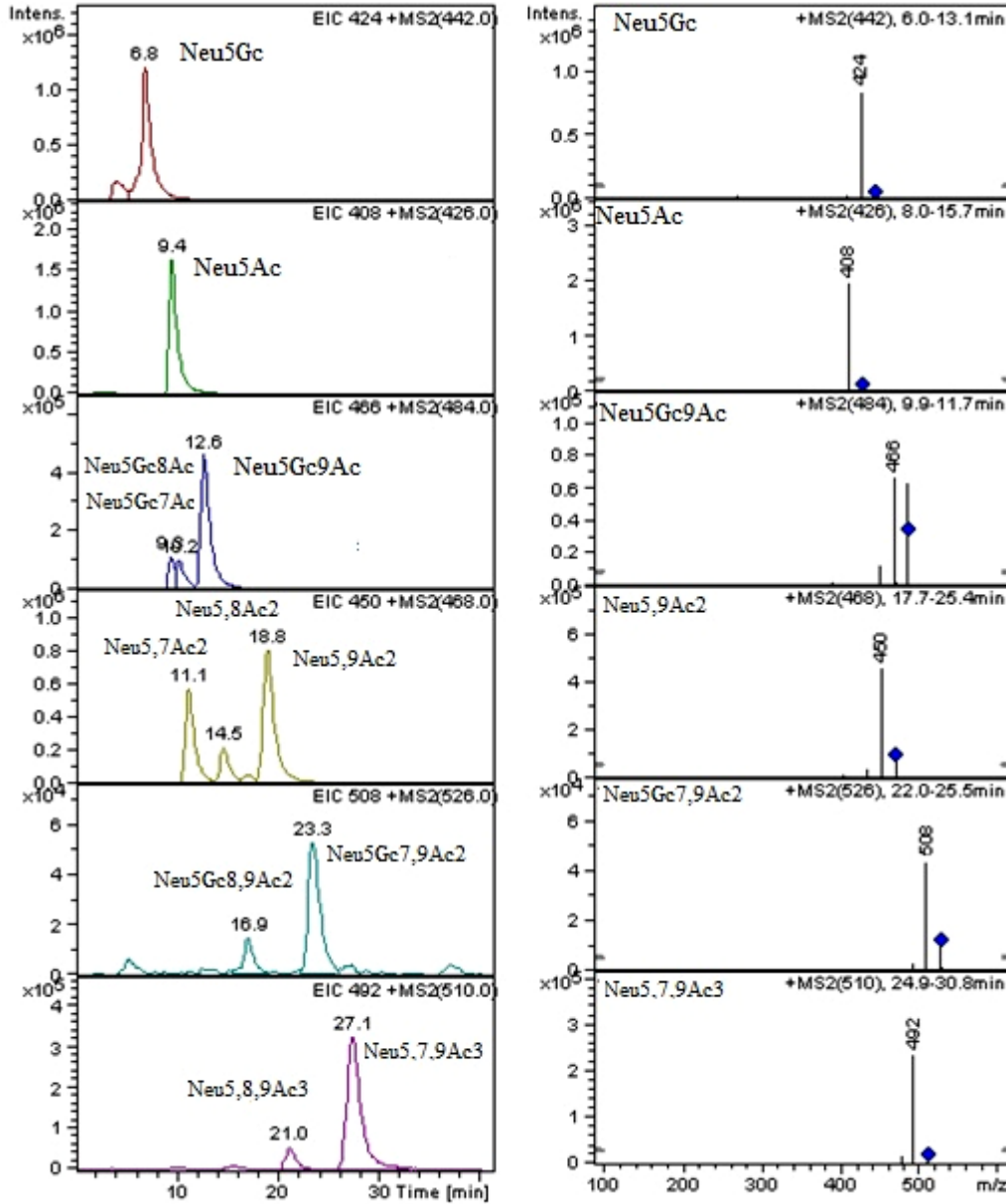
satılmadığından doğal kaynaklardan izole edilerek tespit edilmiştir. Bu amaçla BSM referans madde olarak kabul edilmiş ve yayınlanan bazı çalışmaların ışığında (Klein 1997, Kamerling 2007) standart olarak alınan sialik asitlerin dışında kalan çeşitler LC-MS/MS sisteminde karakterize edilmiştir (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3: LC-ESI-MS/MS ile analiz edilen BSM referans maddesine ait DMB-sialik asit türevleri karakteristik $[M+H]^+$ iyonları, CID parçalanma iyonları ve alıkonma süreleri

Sialik asitler	Rt (dak.)	$[M+H]^+$	Parçalanma iyonları (m/z)	
			$[M+H-H_2O]^+$	
Neu5Gc	6.8	442	424	313-295-268-283-229
Neu5Ac	9.4	426	408	313-295-283-229
Neu7Ac5Gc	9.3	484	466	313-295-229
Neu8Ac5Gc	10.2	484	466	313-295-229
Neu9Ac5Gc	12.6	484	466	313-295-229
Neu5,7Ac ₂	11.1	468	450	313-295-283-229
Neu5,8Ac ₂	14.5	468	450	313-295-229
Neu5,9Ac ₂	18.8	468	450	313-295-229
Neu5,8,9Ac ₃	21.0	510	492	313-295-229
Neu5,7,9Ac ₃	27.1	510	492	313-295-229
Neu8,9Ac25Gc	16.9	526	508	313-295-229
Neu7,9Ac ₂ 5Gc	23.3	526	508	313-295-229

O-asetillenmiş sialik asitlerden iki asetil grup taşıyanlar kendi aralarında ve üç asetil grup taşıyanlar kendi aralarında izomerik yapılarıdır. Dolayısıyla aynı molekül ağırlığında olup aynı elementlerden oluşurlar fakat moleküllerinde atom

gruplaşmaları değişik olduğu için birbirinden farklı özellikler göstermektedirler. Bu yapıları HPLC sisteminde ayırabilmek için elde edilen yöntem başarılı biçimde izomerik yapıların analitik kolonda birbirlerinden ayrılmasını sağlamıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: BSM referans glikoproteini asit hidrolizi ve DMB türevlendirilmesi sonrası CapLC-MS/MS analizi sonucu elde edilen sialik asit kromatogram ve spektrumları.

İzomerik sialik asitlerin varlığı nedeniyle 6 iyonun MRM kanalına yazılmasıyla BSM referans maddesinden 12 adet farklı sialik asit tipi tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.9 ve Çizelge 4.3).

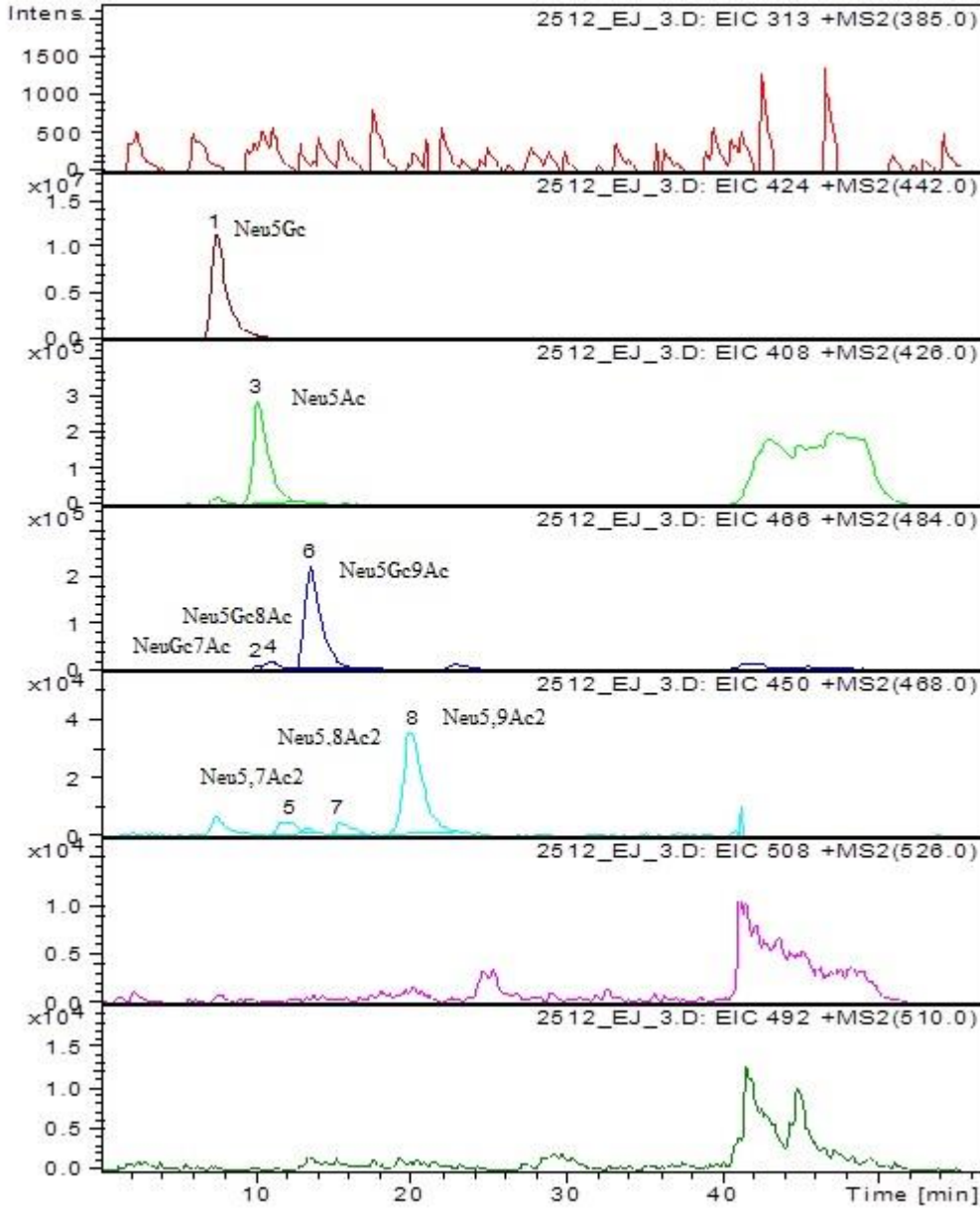
m/z 484 ($[M+H]^+$) iyonu üç farklı tipte sialik asidi ifade eder. Neu5Gc tip sialik asidin 7,8 ve 9 numaralı karbonlarında bulunan $-OH$ gruplarının ayrı ayrı birer asetil grubu taşımasıyla Neu7Ac5Gc, Neu8Ac5Gc ve Neu9Ac5Gc tip sialik asitler meydana gelir. Aynı biçimde m/z 468 ($[M+H]^+$) iyonu Neu5,7Ac₂, Neu5,8Ac₂, Neu5,9Ac₂ tip sialik asitleri ifade eder. m/z 510 ($[M+H]^+$) iyonu 5 numaralı karbonun dışında iki adet asetil grup taşıyan Neu5,8,9Ac₃, Neu5,7,9Ac₃ tip sialik asitleri ifade eder. m/z 526 ($[M+H]^+$) iyonu ise Neu8,9Ac₂5Gc ve Neu7,9Ac₂5Gc tip sialik asitleri temsil eder.

Kütleleri ve parçalanma iyonları aynı olmasına rağmen kolondan çıkış süreleri yani alıkonma zamanları farklı olan bu pikler referanslar (Klein et al.,1997; Kamerling and Gerwig, 2007) eşliğinde tanımlanmıştır.

İzole edilen **yumurta jel kılıfı sialik asitleri** 2 M asetik asit ile hidroliz edildikten sonra DMB ile türevlendirilmiş ve LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogram ve spektrumlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir. m/z 385, 510 ve 526 ana iyon değerlerine sahip sialik asit tiplerine rastlanmamıştır. Bunun dışında bulunan çeşitler Çizelge 4.4'de parçalanma iyonları ve pik alanları yüzde oranları ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.4: Yumurta jel kılıfı Sialik asitleri MRM analizi ve pik alanları

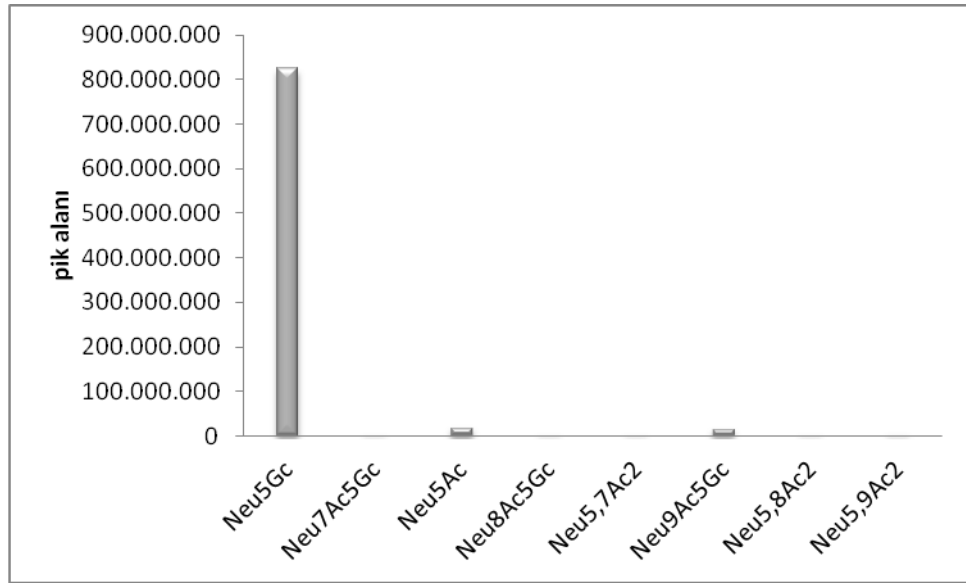
Sialik asitler	Ana iyon $[M+H]^+$ ve Parçalanma İyonları	Pik Alanları	Pik Alan Oranı (%)
Neu5Gc	442>>424	823757410	95,37
Neu7Ac5Gc	484>>466	600850	0,07
Neu5Ac	426>>408	18469282	2,14
Neu8Ac5Gc	484>>466	1260511	0,15
Neu5,7Ac ₂	468>>450	419163	0,05
Neu9Ac5Gc	484>>466	15857077	1,84
Neu5,8Ac ₂	468>>450	309905	0,04
Neu5,9Ac ₂	468>>450	3113684	0,36



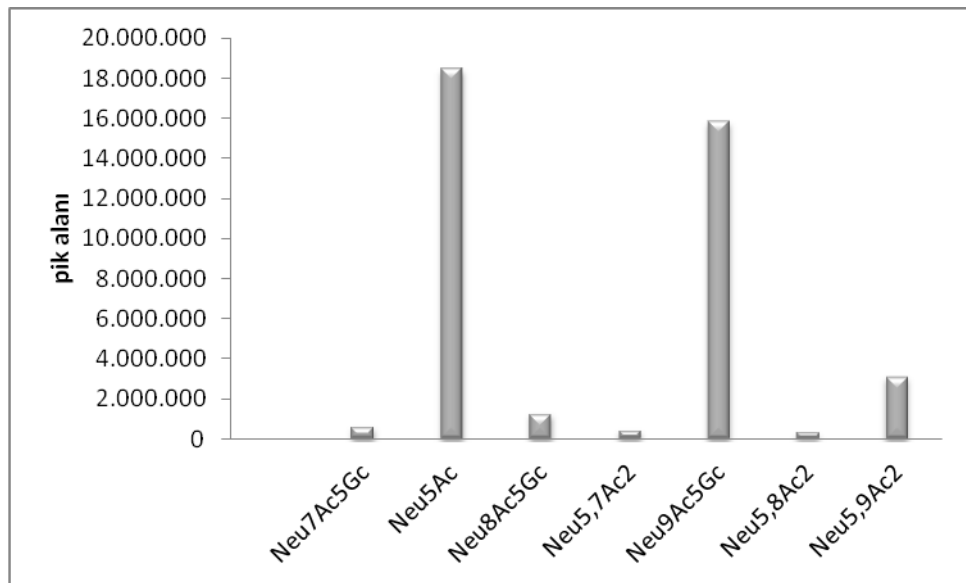
Şekil 4.10: Yumurta jel kılıfı sialik asit tiplerine ait MRM kromatogramları

Mutlak pik alanlarına bakılarak sialik asit çeşitlerine ait grafikler oluşturulmuştur (Şekil 4.11 ve 4.12). Bu değerlendirmelere göre; Neu5Gc tip sialik asit en fazla bulunan sialik asit olup yaklaşık %95 oranındadır (Şekil 4.11). Daha düşük konsantrasyonda bulunan diğer çeşitler Neu5Gc ile birlikte grafikte görünür olamadığı için ayrı bir grafikte değerlendirilmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca, SO^3 grubu taşıyan sialik asitler Neu5AcS ve Neu5GcS' de belirlenmiştir (Şekil 4.13; Çizelge 4.5).

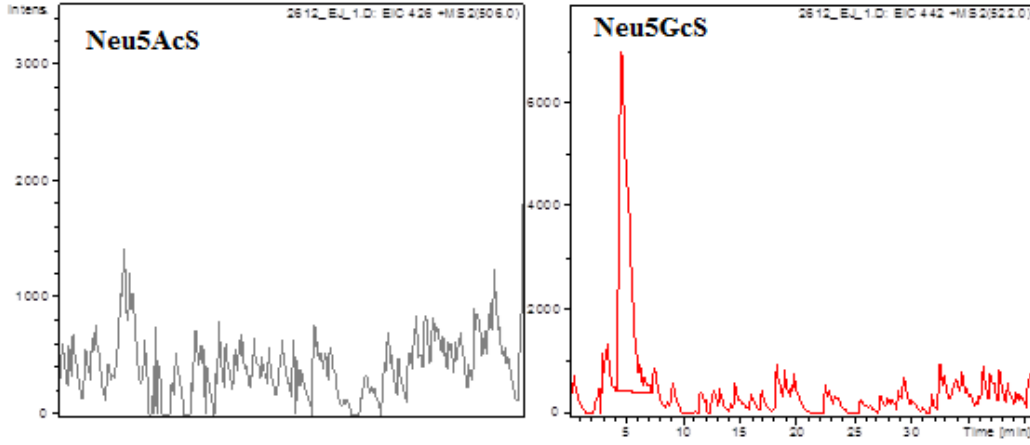
Tüm değerlendirmeler sonucu; Neu5Ac % 2,14 ve ardından Neu9Ac5Gc % 1,84 oranıyla diğer bulunma yuzdesi yuksek bileşenlerdir. Burdan Neu5Gc tip sialik asidin 9 numaralı karbonun asetillenmesi sonucu oluşun Neu9Ac5Gc'nin orantısal gözle bakıldığında çok yuksek olmadığı görölür. Bu durumda Neu5Gc'nin polimerik yapıda veya polisialik yapıda olduğu öne sürülebilir. Çünkü asetilenmiş yapılar daha büyük hacimlerde olduğu için polimerleşmeyi sterik olarak zorlayabilmektedirler.



Şekil 4.11: Yumurta jel kılıfı sialik asitleri dağılımı



Şekil 4.12: Yumurta jel kılıfı sialik asitleri (Neu5Gc hariç)



Şekil 4.13: Yumurta jel kılıfında SO_3^- grubu taşıyan sialik asitler

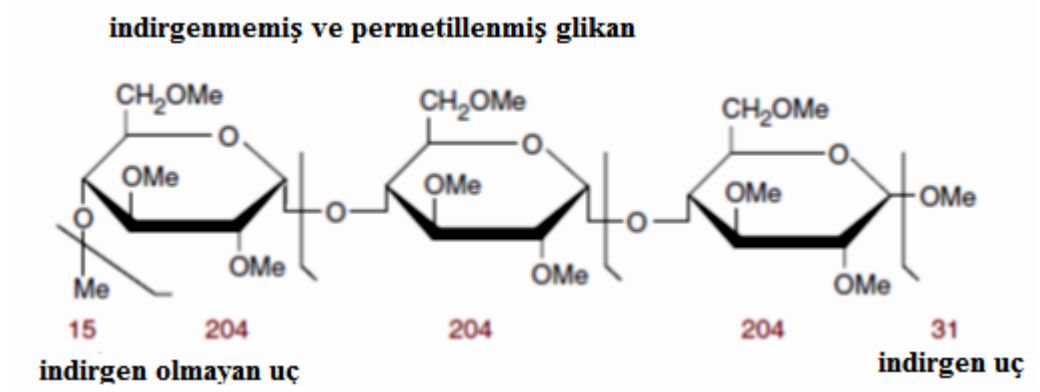
Çizelge 4.5: Kükürt taşıyan Sialik Asit alıkonma süreleri, ana iyon ve parçalanma iyonları.

Sialik asitler	Alıkonma Süresi (dak)	Ana iyon $[M+H]^+$	Parçalanma İyonları
Neu5AcS	5,3	506	426
Neu5GcS	5,1	522	442

4.3. Jel Kılıf Glikoproteinlerinde Glikomik Yaklaşımla Belirlenen N- ve O-Glikanlar

Tipik bir enzimatik glikan analizinde önce N-glikanlar koparılır. Bu amaçla tripsin de kullanılarak sterik etkiler giderilir. O-glikanların koparılması için en sık kullanılan metotlardan biri de yüksek konsantrasyonda borhidrürün ($NaBH_4$) bazik ortamda kullanılmasıdır.

Protein yapısından koparılan ve permetilasyon yöntemiyle türevlendirilen glikanlar artık analize hazır hale gelmiştir. Permetilasyon sonucu yeni oluşan kimyasal yapının kütesinin hesaplanması için meydana gelen reaksiyonların tanımlanması gerekir. Protein kısmından koparılan yani indirgen olan kısım ya da uç yeni iki yapı kazanır ve bu $O-CH_3$ eklenmesiyle olur. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi indirgen olmayan uç da bir $-CH_3$ eklenmesiyle reaksiyonunu tamamlar. Bunların dışında kalan bütün $-OH$ grupları metillenmiştir. Dolayısıyla $(-CH_3) + (O-CH_3) = 46$ atomik kütle birimi (mass unit) ilave olur.



Şekil 4.14: İndirgenmemiş ve permetillenmiş glikan yapılarının şematik gösterimi ve türevlenme reaksiyonu sonrası elde edilen kütle değerleri (Morelle and Michalski, 2007).

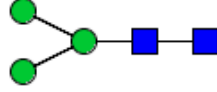
Permetilasyon sonucu yeni oluşan monosakkaritlerin de kütle değerleri hesaplandığında (Çizelge 4.6) oligosakkaritin m/z değeri ve bu sayede de glikan yapısı ortaya çıkarılır.

Çizelge 4.6: Monosakkarit moleküllerinin türevlenmeden önceki özgün mol ağırlıkları ve permetilasyon sonrası kazandığı yeni kütle değerleri. Bu değerler atomik kütle birimi olarak ifade edilir. Kütle spektrometresinde analiz edildiğinde iyonlaştırıcı sistemden kazanacağı katyonik eklentiye (Na^+ , H^+ ...) göre m/z değeri kazanır.

Monosakkaritler	Sembol	Özgün Ortalama Ağırlık (Da)	Permetillenmiş Ortalama Ağırlık (Da)
Pentoz		132.1161	160.1699
Deoksiheksoz	▲ Fuc	146.1430	174.1968
Heksoz	● Gal	162.1424	204.2230
	● Man		
N-asetilheksozamin	■ GlcNAc	203.1950	245.2756
	■ GalNAc		
N-asetil-nöraminik asit	◆ Neu5Ac	291.2579	361.3923
N-glikolil-nöraminik asit	◇ Neu5Gc	307.2573	391.4186

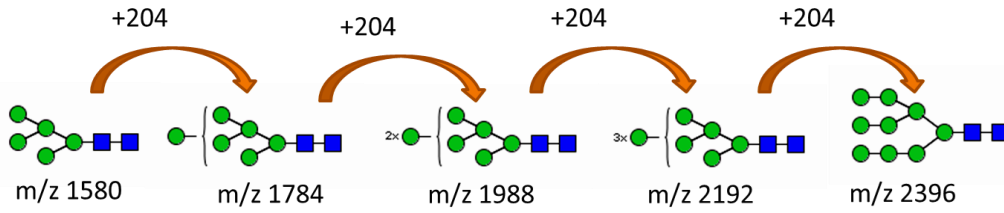
4.3.1 Jel kılıf glikoproteinlerinde glikomik yaklaşımla belirlenen N-Glikanlar

N-glikanların çekirdek yapısı 2 adet GlcNAc ve 3 adet Man birleşiminden oluşur (Şekil 4.15). Genellikle ortak yapı biçimindedir ve şekillenmeler bu çekirdek üzerinden gerçekleşir.



Şekil 4.15: N-glikan çekirdek yapısı.

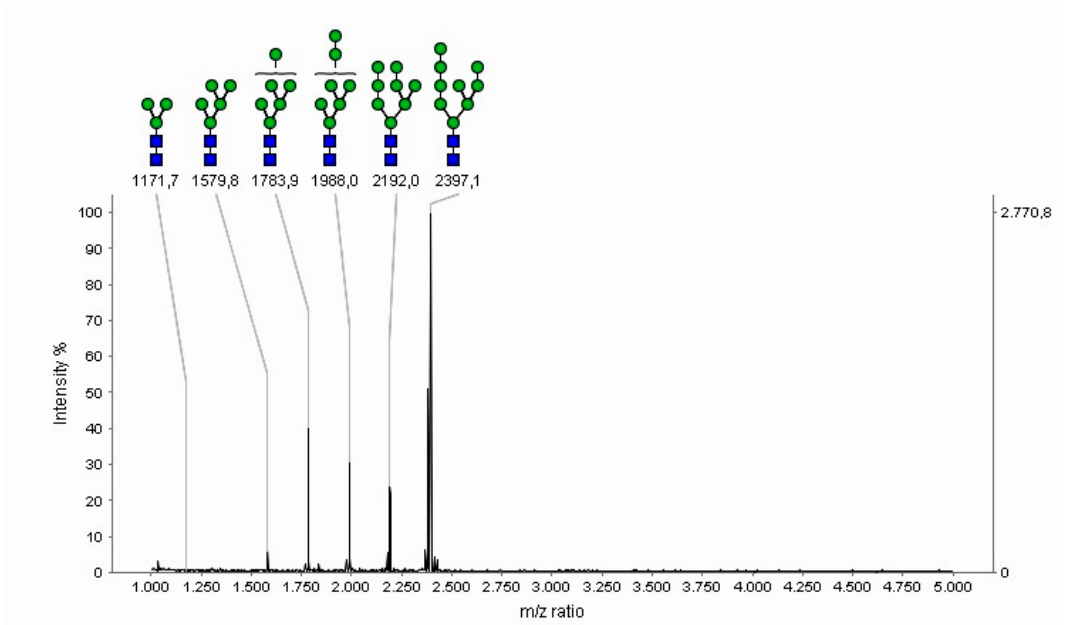
Permetilasyon sonucu türevlendirilmiş yapının m/z değerini hesaplamak için yukarıda belirtilen reaksiyon dikkate alındığında, çekirdek yapının değeri Şekil 4.16'da görüldüğü gibi toplam kütle ve ölçülen m/z değerine göre şu şekilde hesaplanır: $3(\text{Man}) + (2\text{GlcNAc}) + 46 + 23 = 3(204) + 2(245) + 46 + 23 = 1171$ değeri bulunur.



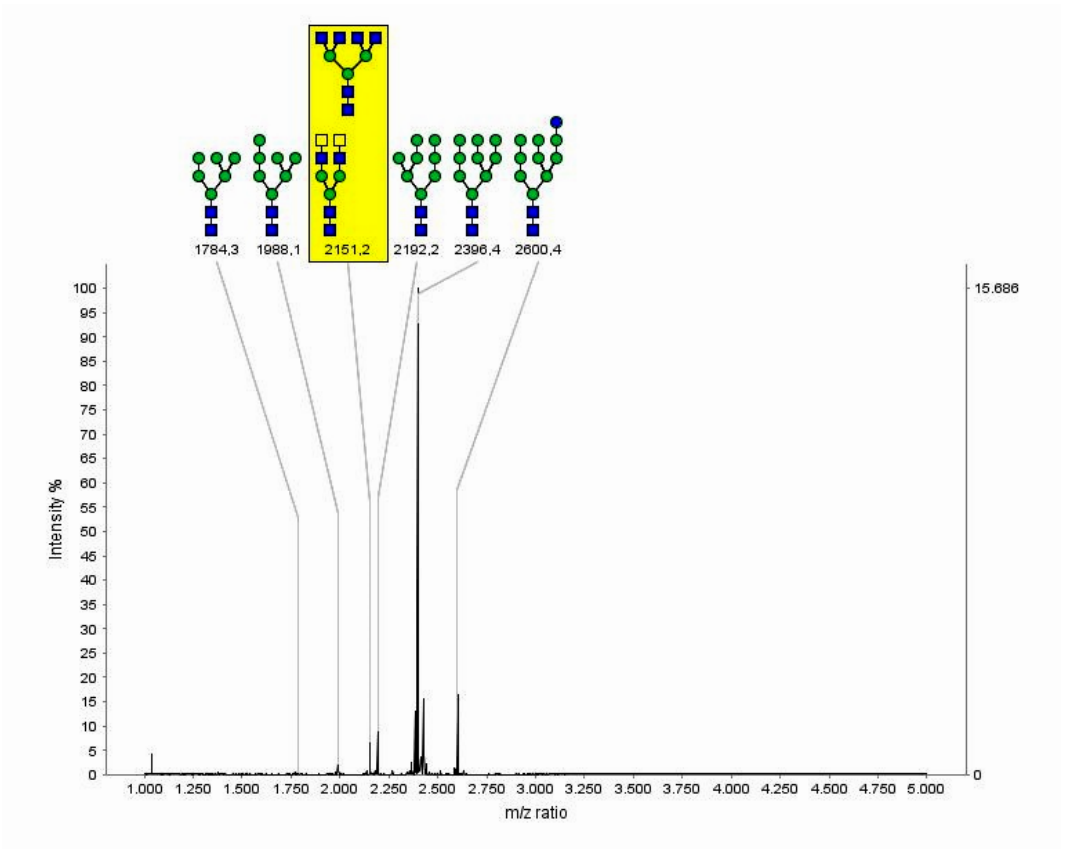
Şekil 4.16: Yüksek mannoz tip N-glikan yapısında her ilave heksoz 204 kütle birimi artışına neden olur.

Bu hesaplama diğer bütün yapılar için temel oluşturmaktadır. Analiz sonrasında elde edilen spektrumlardaki değerler bu hesaplamada ele alınarak, diğer bir deyişle tersten gidilerek kütle spektrometresi değerinin yapısal karşılığı bulunur. Bu hesaplamaların artık bilgisayar üzerinden yapılmasını olanaklı kılan yazılımlar son derece faydalıdır.

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de görülen spektrum değerleri yukarıda açıklanan yöntemle değerlendirildiğinde yumurta jel kılıfından elde edilen glikanların çekirdek yapısı ve onun üzerinden şekillenen yapılar olduğu görülür. MALDI-TOF sisteminin kalibrasyon değerleri ve ondalık basamağından sonraki anlamlı rakamlar tek basamağa indirildiğinde, Çizelge 4.7'de görülen tam sayı eşdeğerinde yüksek mannoz tip memeli benzeri N-glikanlar bulunur.



Şekil 4.17: Yumurta jel kılıfından elde edilen proteinlerin permetillenmiş ve %35 ACN ile elüsyonu yapıp saflaştırılmış N-glikanlarının MALDI-TOF spektrumu.



Şekil 4.18: Yumurta jel kılıfından elde edilen proteinlerin permetillenmiş ve %50 ACN ile elüsyonu yapıp saflaştırılmış N-glikanlarının MALDI-TOF spektrumu.

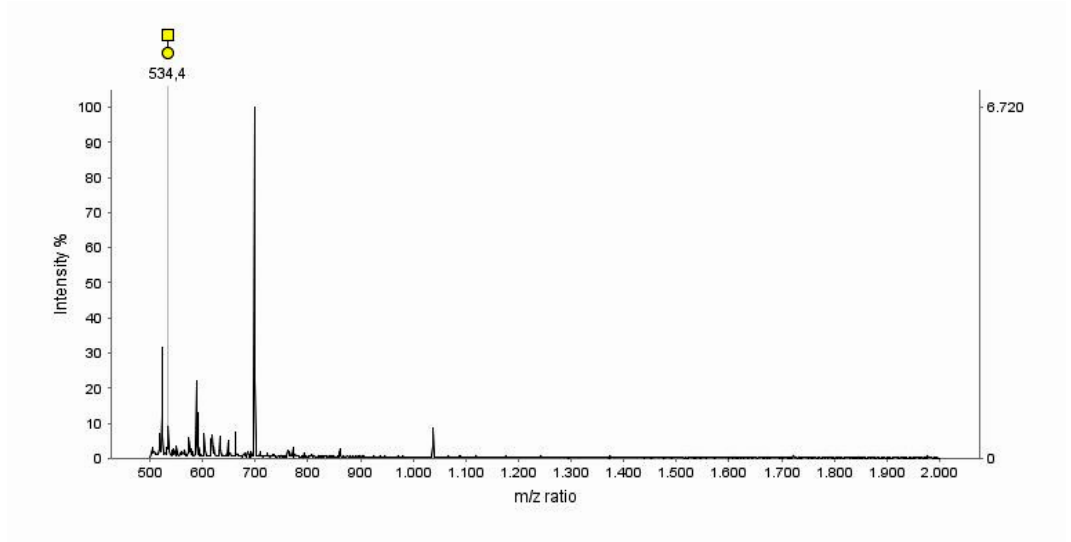
Çizelge 4.7: Yumurta Jel Kılıfından izole edilen permetillenmiş N ve O-Glikan fraksiyonlarının özet gösterimi.

[M +Na] ⁺	1171	1580	1784	1988	2152	2192	2396	2600	534	
Yapı										
NeuNAc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fuc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Gal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Man	3	5	6	7	3	8	9	10	0	
GlcNAc	2	2	2	2	6	2	2	2	0	
GalNAc	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

O-Glikan analizinde bazik ortamda borhidrür varlığında β -eliminasyon reaksiyonu ile elde edilen glikanlar permetillenmiş ve saflaştırılmış ardından MALDI-TOF sisteminde analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda Şekil 4.19'da görüldüğü gibi sadece çekirdek1 (core1) yapısında ve T-antijen olarak da adlandırılan yapı gözlemlenmiştir. O-glikan m/z değerinin hesaplanmasında 1 adet Gal ve 1 adet GalNAc ve diğer reaktifler toplanır.

$1(\text{Gal}) + 1(\text{GalNAc}) + 15 + 47 + 23 = 1(204) + 1(245) + 15 + 47 + 23 = 534$ bulunur.

Permetillenmiş glikan yığını sodyum ekli biçimiyle m/z 534 değerinde spektral pik oluşturmuştur.



Şekil 4.19: Yumurta jel kılıfından elde edilen proteinlerin permetillenmiş saflaştırılmış O-glikanlarının MALDI-TOF spektrumu.

MALDI-TOF sistemi ile analiz edilen yumurta jel kılıfı glikan yapıları Çizelge 4.7’de özetlenmiştir. Burada görüldüğü gibi sadece yüksek mannoz tipte N-glikan yapıları tespit edilebilmiştir. Bunun yanında %50 ACN ile elüe edilen kısımda kompleks tip N-glikan yapısına geçiş olarak da tanımlanabilecek m/z 2152 olan araform da gözlenmiştir. Bu iyona ait spektral yanıtın zayıf olduğu gözönünde bulundurulduğunda baskın oligosakkarit yapının yüksek mannoz olduğu sonucuna varılmaktadır.

Tespit edilen iyonların m/z $[M+Na]^+$ değerleri 1171, 1580, 1784, 1988, 2192, 2396 ve 2600 olup yüksek mannoz tip N-glikanları ifade eder ve $Man_{3-10}GlcNAc_2-Asn$ dizisinden permetilasyon sonucu oluşan oligosakkarit birimlerinin MALDI-TOF sisteminden elde edilen değerlerdir. m/z 2152 iyonu ise $GlcNAc_4-Man_3-GlcNAc_2$ oligosakkarit yapısına ait olarak hesaplanan değerdir (bkz. Çizelge 4.7). Yüksek mannoz tip N-glikanlarda ardışık sırada değer artışının 204 Da olduğu görülür ve bu da ilave her bir mannoz molekülünden kaynaklanır. Bunun dışında N-glikanlarda sialik asit ve fukoz eklentisine rastlanmamıştır. Hücre yüzey proteinlerinin çoğunlukla yüksek mannoz glikoformlar taşıdığı belirtilmiş ve yumurta jel kılıfı da hücre dış katmanı olduğu için bu yapının olağan olduğu ve denizkestanesi yumurtasında var olduğu ortaya konmuştur.

MALDI-TOF sisteminde analizi yapılan N-glikan fraksiyonlarının yığın kütle değerleri tespit edilmiş ve biyosentez bilgisi ile karşılaştırılarak yüksek mannoz yapıları tahmin edilmiştir. Fakat MALDI-TOF/TOF sistemiyle MS/MS parçalanma iyonları elde edilememiştir. Dolayısıyla yapıya ait detaylı bilgiler TOF sisteminde elde edilmemiştir.

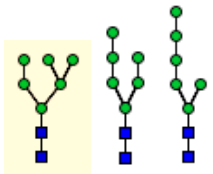
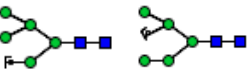











Hazırlanan N-glikan örneklerine ait daha fazla veri elde edebilmek ve MS/MS parçalanma ürünlerini elde edebilmek amacıyla capLC-ESI-MS/MS sisteminde analizler yapılmıştır. Örnekler 100 µL metanol-su karışımında çözülüp LC-MS sistemine enjekte edilmiştir. %35 ACN fraksiyonundan elde edilen permetillenmiş N-glikanlara ait MALDI-TOF sisteminde tespit edilmiş olan iyonlardan m/z 1784, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, m/z 1988, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, m/z 2192, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, m/z 2396, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosakkaritleri LC-MS sisteminde yüksek verimle analiz edilmiş ve parçalanma iyonları karakterize edilmiştir.

Pseudo moleküler iyonlar pozitif modda çalışılmış ve 2+ yüklü biçimiyle ele alınmıştır. MS/MS sisteminde parçalanma iyonlarının elde edilmesi amacıyla kullanılan iyonlar iki sodyum ilavesi sonucu oluşan yapılardır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8: Permetilasyon sonucu türevlendirilen ve MALDI-TOF sisteminde tek pozitif yük ile tanımlanan yüksek mannoz tip glikanlar ESI-MSⁿ sisteminde, sistemin doğası gereği, 2+ iyonlaşarak ana iyonu oluşturmuştur. Örneğin $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ için gerçek kütle $1784-23=1761$ 'dir. ESI-MSⁿ sistemde gözlenen ana iyon m/z : $(1761+2(23))/2=903,5$ bulunur.

	MALDI-TOF m/z ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)	ESI-MS ⁿ m/z ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$)
$\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$	1580	801,5
$\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$	1784	903,5
$\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$	1988	1005,5
$\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$	2192	1107,6
$\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$	2396	1209,6

Çizelge 4.9: capLC-MS/MS sisteminde $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ yapısını ifade eden m/z 903,5 iyonunun parçalanma ürünlerine ilişkin olası yapıları ve parçalanma iyon tipleri (Spektrum veri değerlendirmeleri ve figürlerin oluşturulması Glycoworkbench programı ile yapılmıştır).

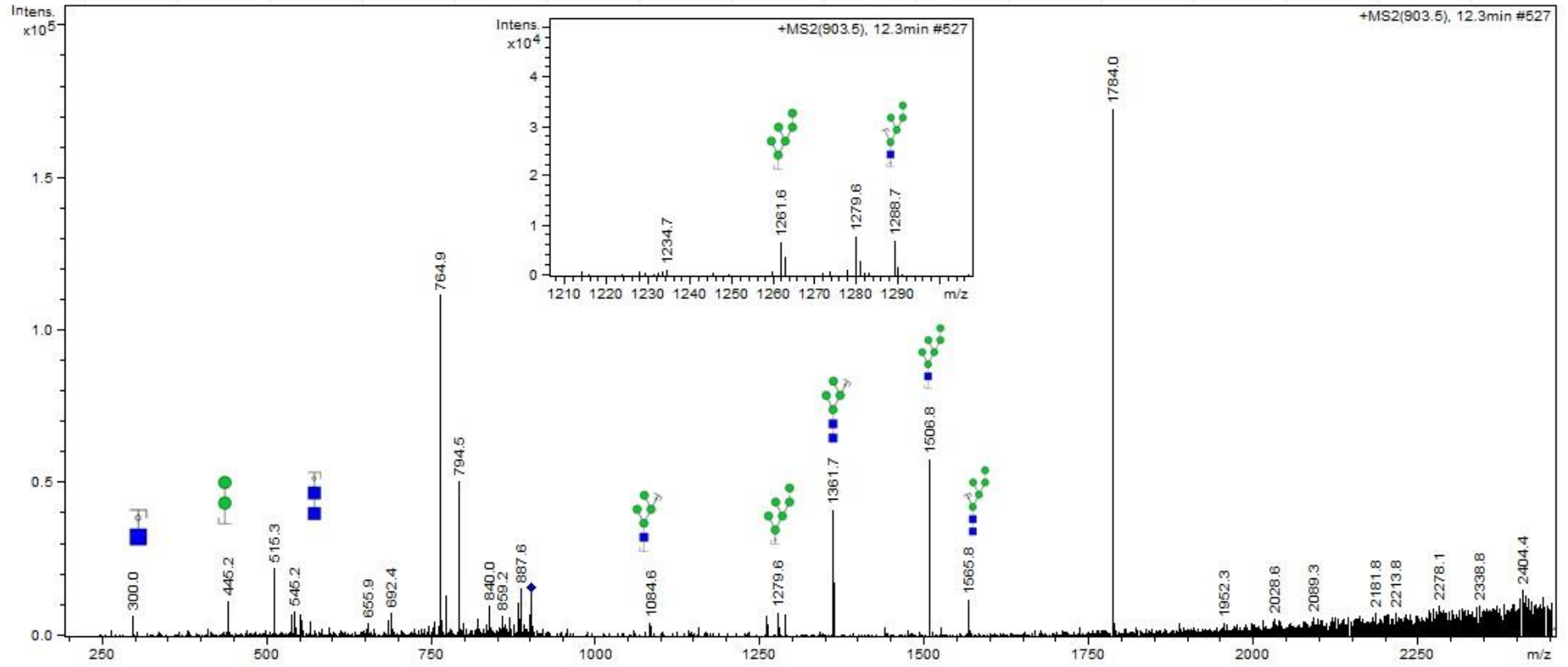
m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$	Parçalanma iyonlarının olası yapıları	İyon tipi
1784 (Ana iyon ve olası biçimler)		
1565,8		Y
1506,8		B
1361,7		Y
1288,6		BY
1279,6		C
1261,6		B
1084,6		BY
635,3		BY-CZ
545,3		Y
445,2		B
413,2		
300,1		

$\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ yapısını ifade eden m/z 903,5 iyonunun parçalanma ürünlerine ilişkin spektrum Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Ana kütle değeri 1761 Da olan yüksek mannoz tip glikan iki sodyum iyonu eklenmesi sonucu m/z 903,5 iyonu oluşmuştur. ESI-MS/MS çalışmasında bu iyonun MRM sonucunda majör olarak m/z 1784 iyonu tespit edilmiştir. Bu da m/z 903,6 iyonundan bir sodyum ayrılması sonucu oluşan yapının değeridir.

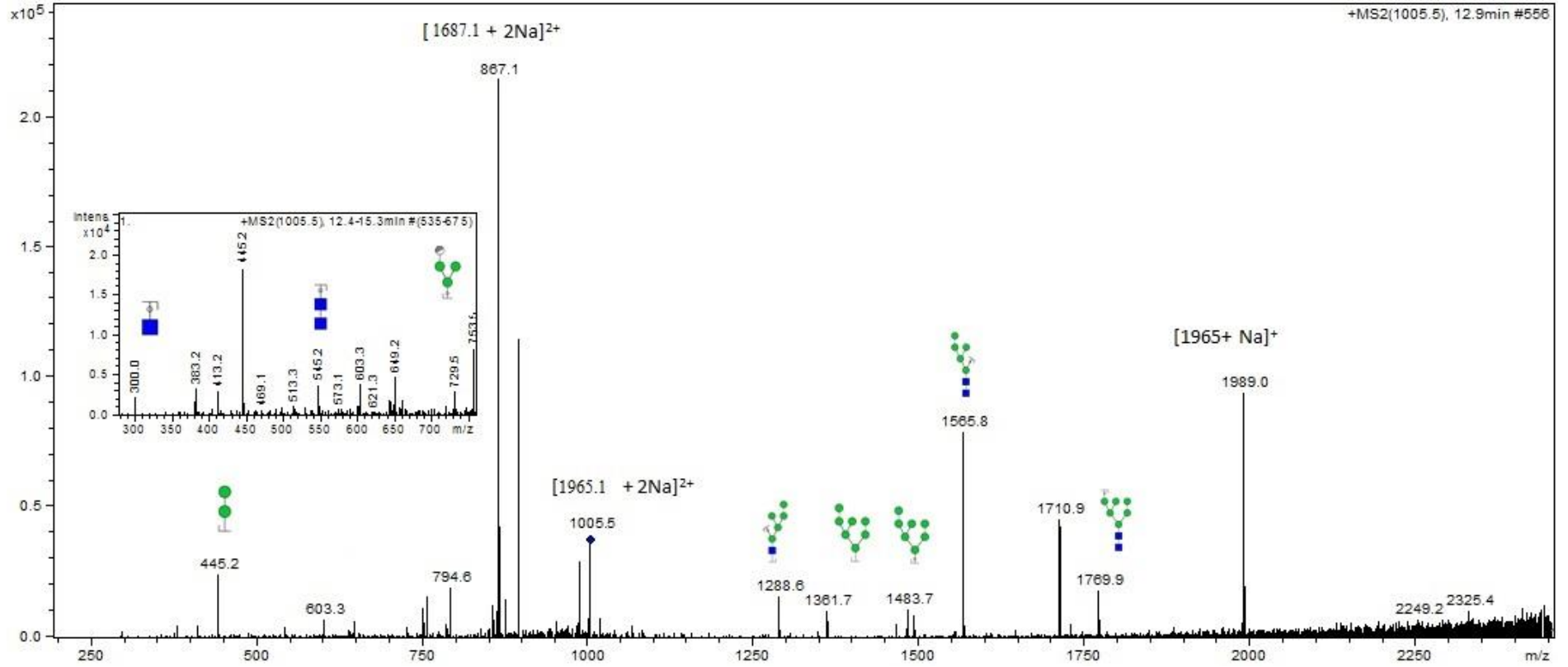
İyonlardan m/z 1565,8 iyonu bir mannozun glikozidik bağın kopması sonucu yapıdan uzaklaşmasıyla elde edilen değerdir (bkz. Çizelge 4.9). Bu tip parçalanma ile oluşan önemli iyonlardan biri de m/z 1506,8 olup yapıdan bir GlcNAc uzaklaşması ile elde edilir. m/z 1288,6, 1279,6 ve 1261,6 mannoz dallanmalarının memeli benzeri geliştiğini ortaya koyacak değerli bilgiler sunan parçalanma iyonlarıdır.

m/z 1784 iyonu için olası üç yapı sembol biçiminde gösterilmiştir (bkz. Çizelge 4.9). Aynı kütleyle sahip farklı yapılarda olabilecek bu glikanların gerçek dizisi MS/MS sitemi ile ortaya konmuş ve yukarıda da açıklanan iyonlar sayesinde yapının sarı zemin rengi ile belirtilen profilde olduğu anlaşılmıştır.

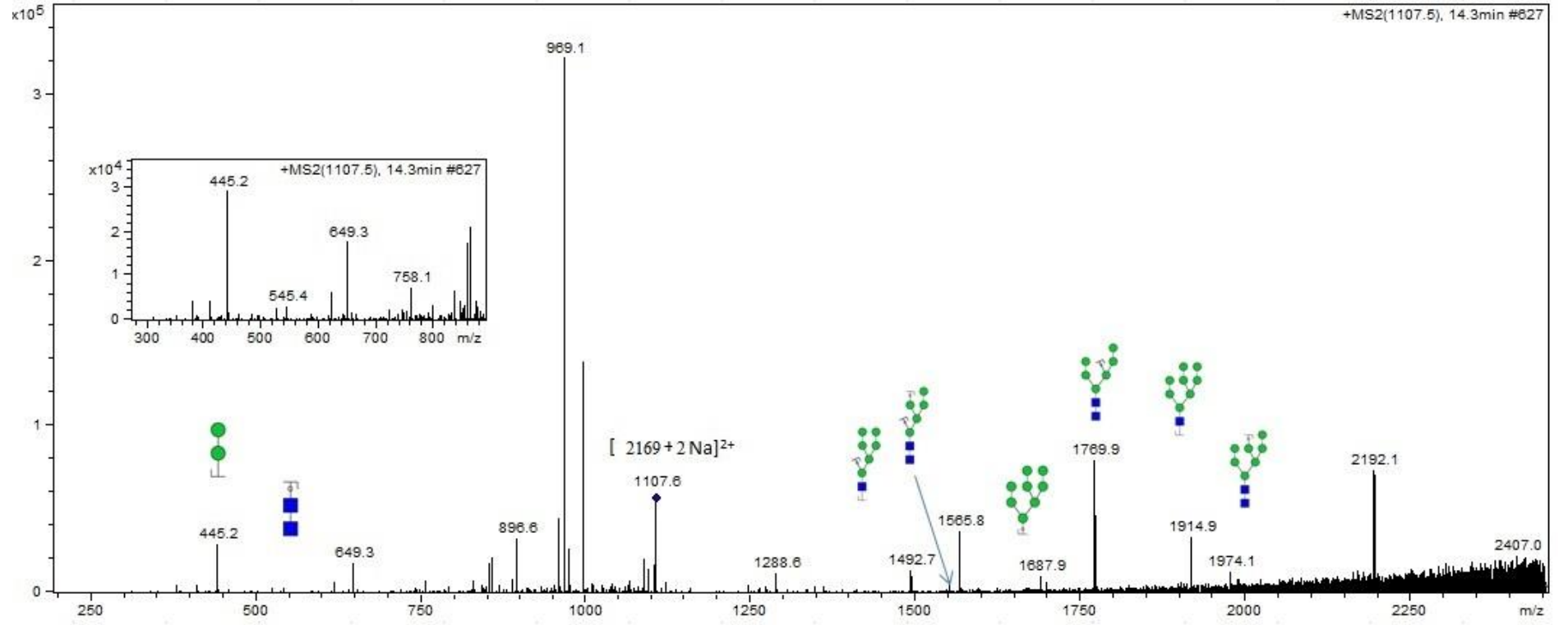
Şekil 4.21'de m/z 1005,5 iyonu ve parçalanma iyonları gösterilmiştir. m/z 1107,6 ve 1209,6 parçalanma iyonlarına ilişkin spektrumlar ise sırasıyla Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te yapısal olarak da gösterilmiştir



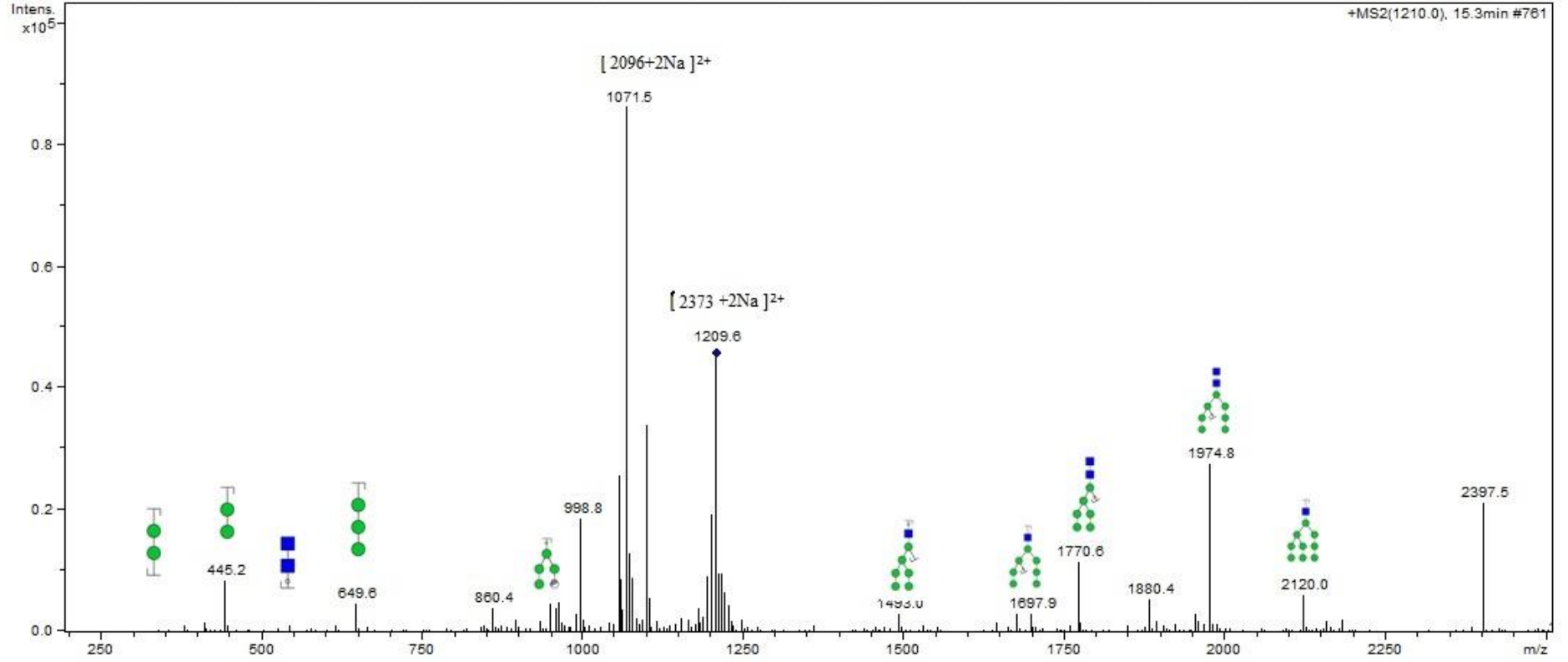
Şekil 4.20: m/z 903,5 ([1761+2Na]²⁺) iyonun MS/MS parçalanması sonrası elde edilen spektrum



Şekil 4.21: m/z 1005,5 ([1965+2Na]²⁺) iyonun MS/MS parçalanması sonrası elde edilen spektrum.



Şekil 4.22: m/z 1107,6 ($[1761+2Na]^{2+}$) iyonun MS/MS parçalanması sonrası elde edilen spektrum.

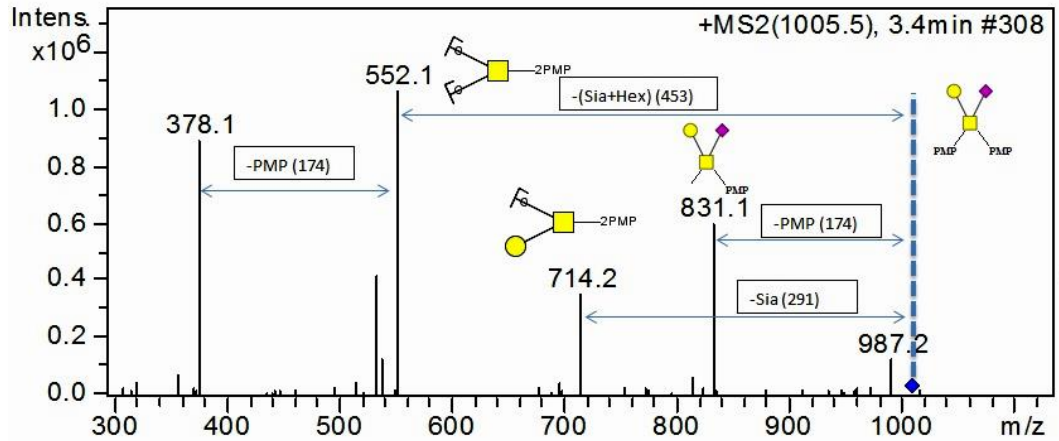


Şekil 4.23: m/z 1210 ($[1761+2Na]^{2+}$) iyonun MS/MS parçalanması sonrası elde edilen spektrum.

4.3.2 Jel kılıf glikoproteinlerinde glikomik yaklaşımla belirlenen O-Glikanlar

O-glikan analizinde kullanılan enzimler sınırlı olup bütün O-glikanları peptit yapısından koparabilecek evrensel bir enzim henüz tespit edilememiştir. Bu yüzden O-glikanlar β -eliminasyon reaksiyonu ile serbest bırakılıp analiz edilmiştir. İyonizasyon verimini ve kromatografik ayrılmayı verimli kılabilmek için PMP ile türevlendirilmiştir. Ayrıca bu sayede parçalanma iyonlarından yapı hakkında daha kolay ve net bilgi edinilebilmektedir.

Çalışma önce bilinen bir protein üzerinde denenmiş ve literatür bilgisi ile karşılaştırılıp uyumlu olduğu anlaşılmıştır. Şekil 4.24'te görüldüğü gibi fetuin standart proteininden elde edilen O-glikan yapılarından biri olan Sia-Gal-GalNAc tanımlanmıştır. 2 adet PMP molekülünün indirgen kısımdan reaksiyona girerek tamamlan türevlenme reaksiyonuyla Sia-Gal-GalNAc-2PMP yapısının bir proton eklenmesiyle pozitif moda m/z değerinin 1005,5 Da olduğu bulunmuştur.

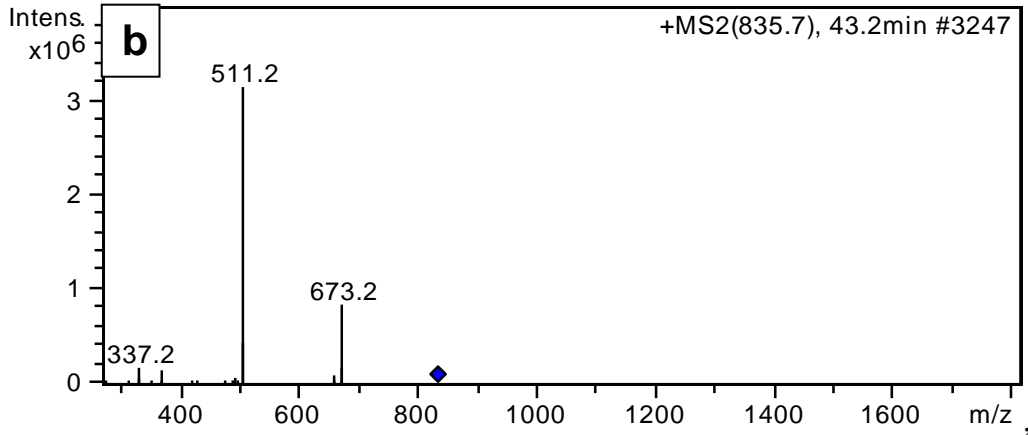
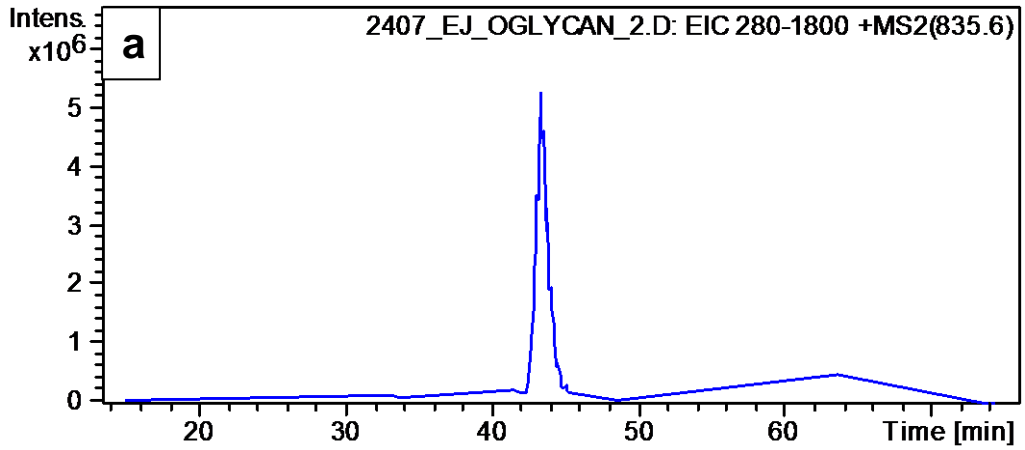


Şekil 4.24: Fetuin standart proteininin O-glikan analizi sonrası elde edilen yapılardan Sia-Gal-GalNAc yapısına ve parçalanma iyonlarına ait spektrum.

Yumurta jel kılıfına ait PMP ile O-glikan analizi capLC-MS/MS sistemine yapılmıştır. Bilinmeyen örneklerin analizinde çok önemli avantajlar sağlayan AutoMsⁿ tekniği ile belirli sinyal değerinden yüksek tüm iyonlar rasgele taranmıştır. Daha sonra detaylı analizlerin bazıları saptanan iyonların tek tek çalışılmasıyla aydınlatılmıştır. Bazı iyonlar protonlanmış biçimde yüksek sinyal oluştururken bazıları sodyum iyonunu tercih edebilmektedir. PMP ekli şekerler alditol biçimine göre 328 Da daha fazladır.

Şekil 4.25’de, m/z 835 iyonuna ait kromatogram ve spektrum görülmektedir. Proton eklenmesi ile elde edilen bu iyonun MS/MS sisteminde parçalanması sonucu karakteristik iyonlar elde edilmiştir.

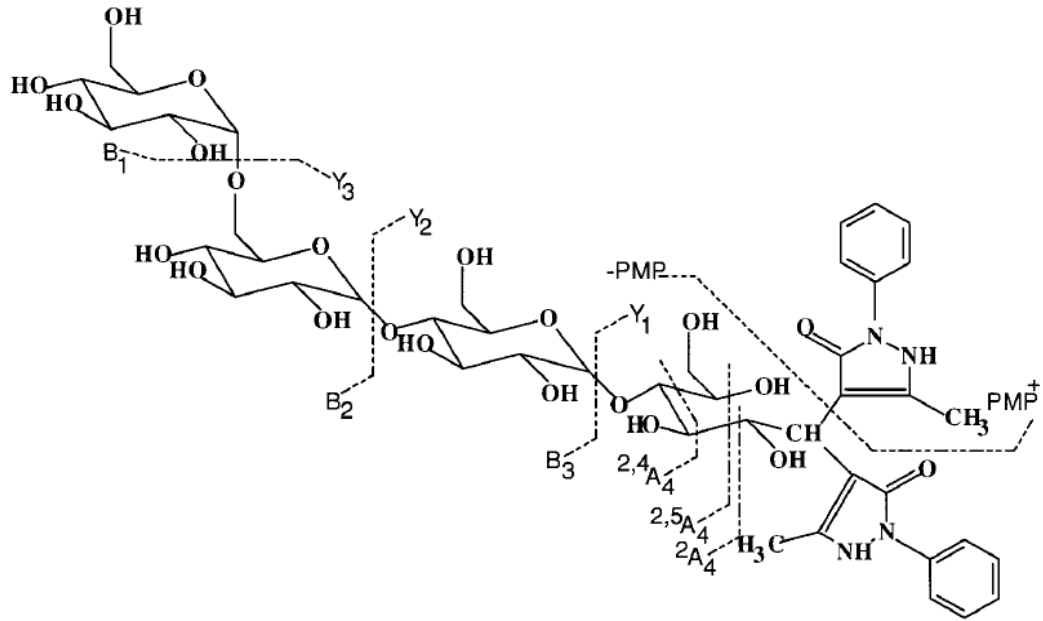
Spektrumda gözlenen m/z 835,7 iyonunda oluşan glikozidik bağ kırılmasıyla bir heksoz ayrılır ve -162 Da fark yaratarak m/z 673,2 (Y2 tip) iyonu meydana gelir. Buna benzer olarak 2 heksoz ayrılması sonucu m/z 511,2 (Y1 tip) iyonu gözlenir. Parçalanma sonucu oluşan m/z 511 iyonundan bir PMP molekülünün kopması sonucu -174 Da farkla m/z 337 iyonu oluşur.



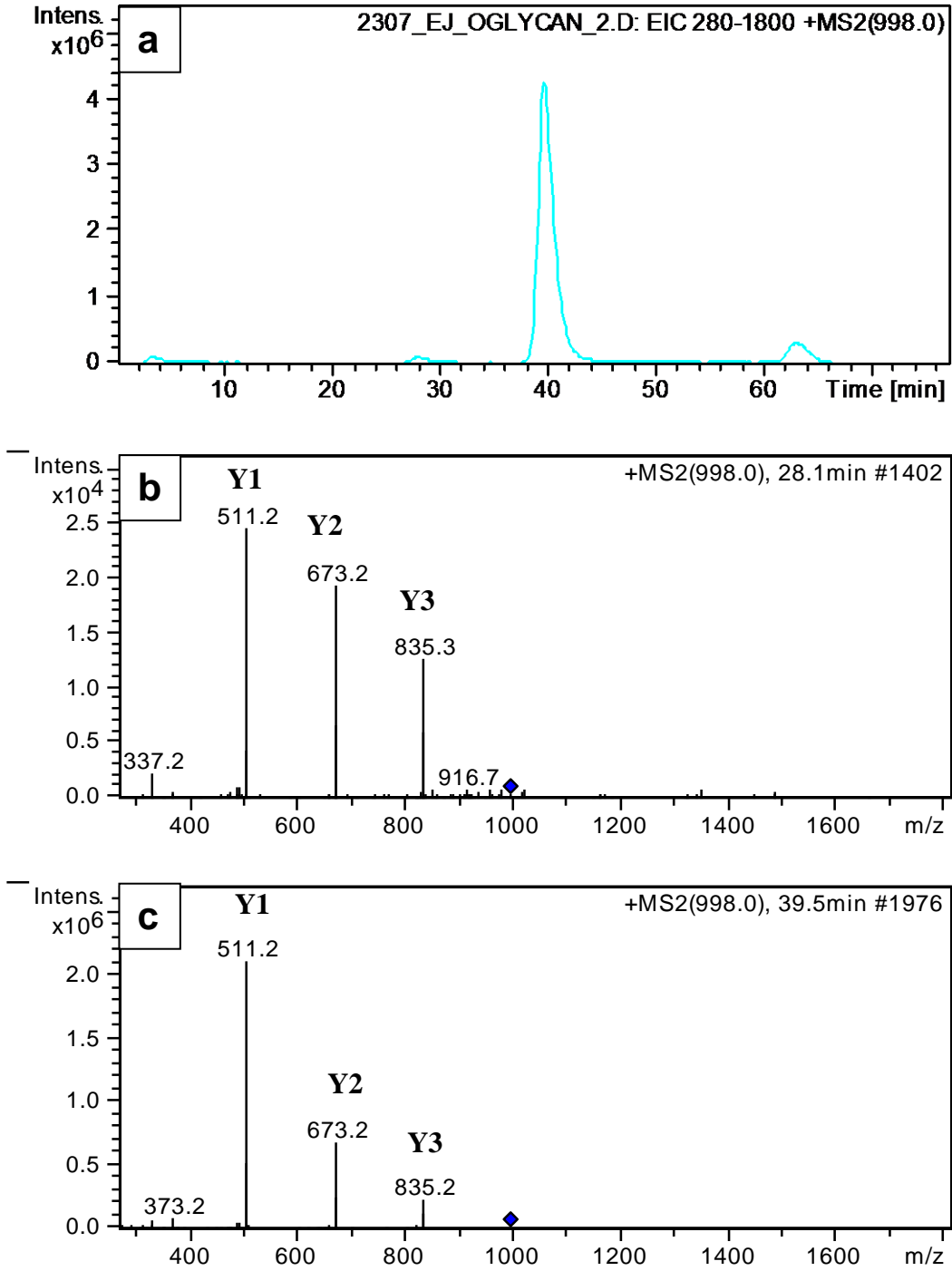
Şekil 4.25: Hek₃-PMP₂: m/z 835 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrum (b).

Şekil 4.26'da dört heksoz molekülünden meydana gelen bir oligosakkarit yığınının PMP ile türevlenmesi sonucu oluşan yapı görülmektedir. Kütle spektrometresinde, MS/MS parçalanma ile elde edilebilecek iyonlar şekil üzerinde gösterilmiştir.

Şekil 4.26'da gösterilen oligosakkarit yığınının m/z değeri 998 olup bu yapıya ait kromatogram ve spektrum Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Bu spektrumda da görüleceği gibi daha çok Y tip parçalanma iyonları elde edilmektedir. Ayrıca her parçalanma iyonu da ilginç biçimde indirgen uç kısmını taşımaktadır. İyon trap MS sistemini fiziksel ve elektronik koşullardan dolayı sınırlayan 1/3 kuralı dolayısıyla karakteristik m/z 175 PMP iyonu gözlenmemektedir. PMP ile türevlendirilen ve proton iyonlaşmış ($[M+H]^+$) iyonlarla çok anlamlı ve çözümlenebilir parçalanma iyonları oluşmakta ve bu sayede oligosakkarit analizi daha verimli hale gelebilmektedir. Şekil 4.27 m/z 998 iyonuna ilişkin iki spektrum gösterilmiştir. Kromatogramdan da anlaşılacağı gibi iki farklı zamanda kolondan çıkan bu yapıların dizilerinin farklı olduğu düşünülebilir. Bu yapılar parçalanma ürünlerinden anlaşılammaktadır fakat bağ tipi veya dizi özelliği polarite farklılığı yaratmakta ve dolayısıyla kolondan farklı zamanlarda çıkmaktadırlar.

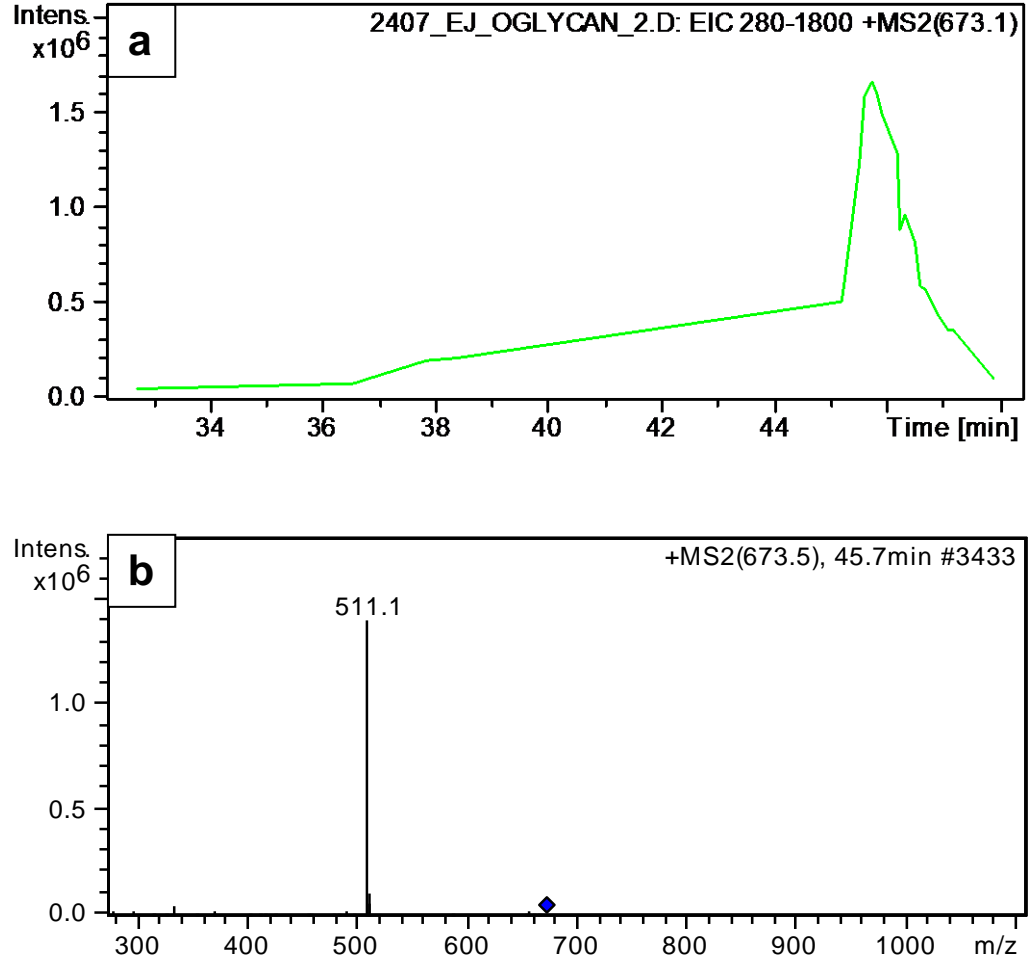


Şekil 4.26: Glc₄-PMP₂: m/z 998 iyonu ESI-MS/MS iyonu yapısı ve parçalanma yolağı (Shen and Perreault, 1999).



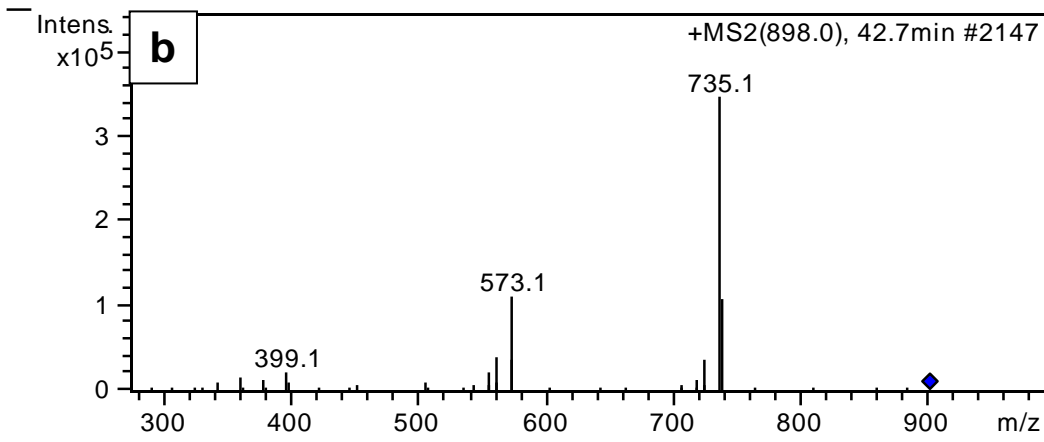
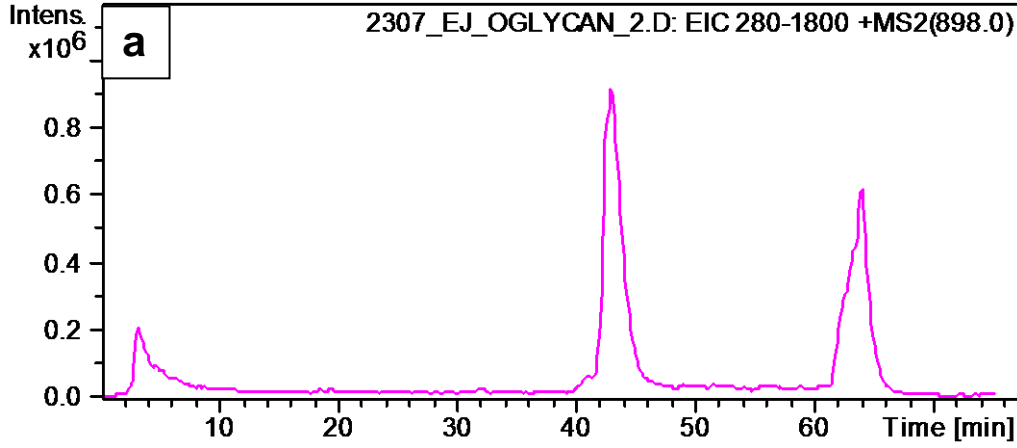
Şekil 4.27: Hek₄-PMP₂: m/z 998 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrumlar (b ve c).

Şekil 4.28’de görülen m/z 673 iyonu (laktoz) da yukarıda anlatılan yapılarla benzer olup iki heksoz ile türetilen disakkarit yapısına ait iyonudur. Oluşan parçalanma iyonları da aynı biçimde ele alınarak değerlendirilir.



Şekil 4.28: Hek₂-PMP₂; m/z 673 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrum (b).

Şekil 4.29’da m/z 898 iyonu yapısında bir adet N-asetilgalaktozamin bulunduran glikanı ifade eder. Bu şekerin varlığı ile yapının sodyum ekli biçimi ile yüksek sinyal elde edildiği gözlenmiştir. Sodyum ekli bir iyonun parçalanması ile oluşan iyonlardan elde edilecek bilgi proton kadar verimli olmayabilmektedir.

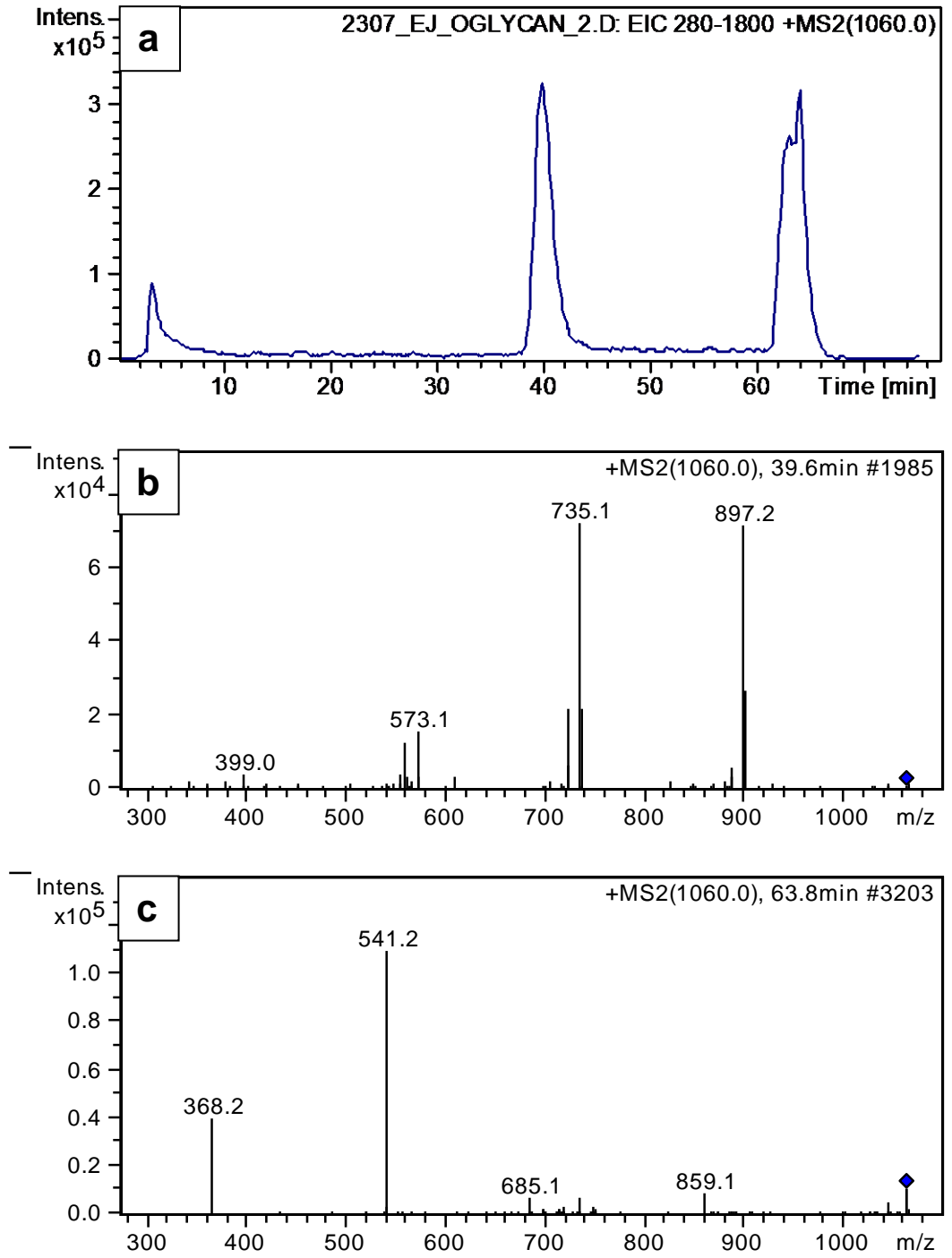


Şekil 4.29: Hek₂-HekNAc-PMP₂: m/z 898 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrum (b).

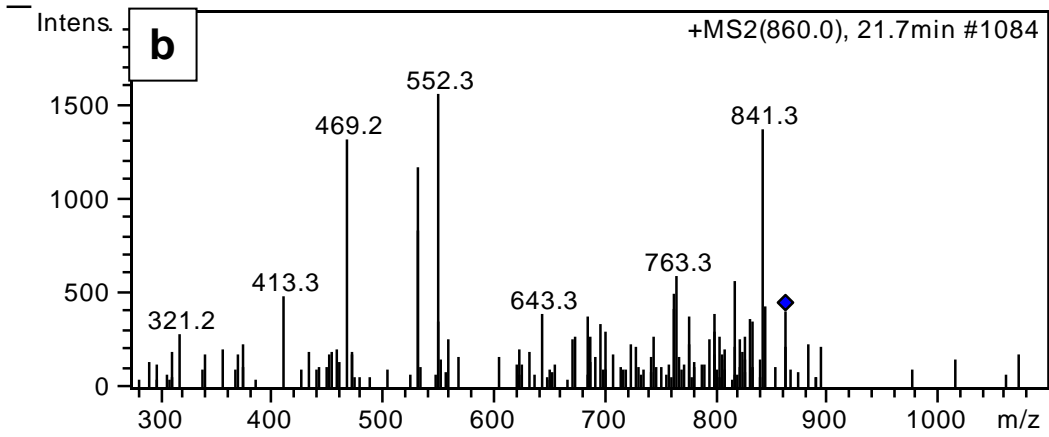
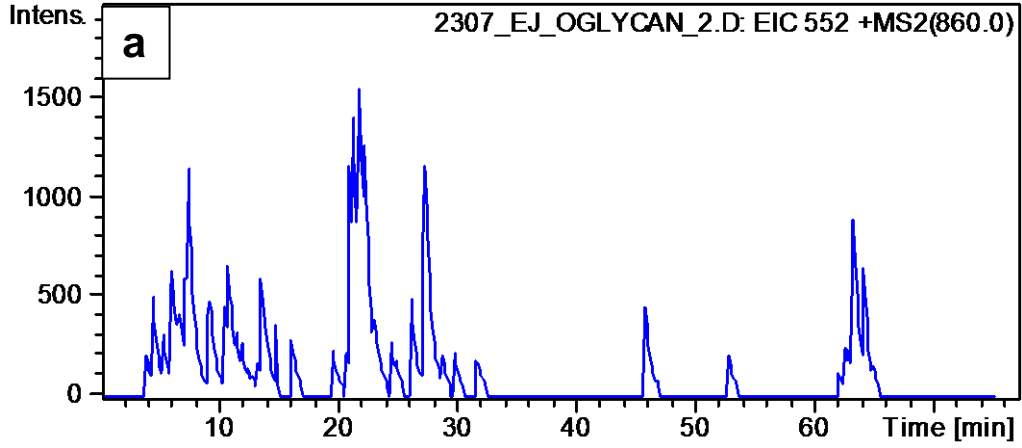
Şekil 4.30'da m/z 1060 iyonu yapısında bir adet N-asetilgalaktozamin ve üç adet heksoz bulunduran glikanı ifade eder. Elde edilen iyon sodyum ekli bir yapıdır.

Şekil 4.31'de m/z 860 iyonu yapısında bir adet N-asetilgalaktozamin ve bir adet Neu5Gc tip sialik asit bulunduran glikanı ifade eder. m/z 860 iyonunun parçalanması sonucu m/z 552 iyonunun elde edilmesi ile 308 Da kütle farkı oluşur. Bu da Neu5Gc'nin HekNAc yapısından kopmasıyla açıklanır. O-glikan analizinde gözlenebilen tek sialik asitli glikan yapısıdır.

Çizelge 4.10'da, yumurta jel kılıfından izole edilen ve PMP ile türevlendirilmiş O-Glikan fraksiyonlarının özet gösterimi verilmiştir.



Şekil 4.30: Hek₃-HekNAc-PMP₂: m/z 1060 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrumlar (b ve c).



Şekil 4.31: Hek-Neu5Gc-PMP₂: m/z 860 iyonu ESI-MS/MS iyonuna ilişkin kromatogram (a) ve spektrum (b).

Çizelge 4.10: Yumurta Jel Kılıfından izole edilen ve PMP ile türevlendirilmiş O-Glikan fraksiyonlarının özet gösterimi.

[M + H] ⁺	1005	835		998		673	1060*	898*	860
Yapı									
Neu5Ac	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Neu5Gc	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Fuc	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hek	1	3	3	4	4	2	3	2	0
HekNAc	1	0	0	0	0	0	1	1	1

*Na kation

4.4 Bulgulara İlişkin Temel Sonuçlar

1) Jel Kılıf Protein/Glikoprotein Profiline SDS-PAGE ve Lektin Blotlama ile Karakterizasyonu sonucunda; SDS-PAGE ile ~250, 55, 50 ve 15 kDa civarında dört protein bandı ayırt edilmiştir. PAS boyama ile 250, 35 ve 10 kDa civarındaki proteinlerin glikozilli oldukları, bunlardan da sadece 250 kDa civarındaki büyük proteinin glikoprotein olduğu anlaşılmıştır. 35 ve 10 kDa civarındakiler olasılıkla proteoglikandır.

2) Jel Kılıf Glikoproteinlerinde Monosakkarit analizi sonucunda; Monosakkarit analizi sonucu yumurta jel kılıfında sırasıyla en fazla fukoz olmak üzere mannoz, arabinoz+ksiloz, galaktoz, glukoz, N-asetilgalaktozamin ve N-asetilglukozamin bulunmuştur. Riboz da örnek hazırlama aşamasında materyale dahil olan genetik materyalden kaynaklanmaktadır. Yine monosakkarit ailesin olan fakat farklı analiz yöntemiyle analiz edilen sialik asit sonuçlarına göre en fazla Neu5Gc bulunmuştur. Ardından Neu5Ac, Neu9Ac5Gc, Neu5,9Ac₂, Neu8Ac5Gc, Neu7Ac5Gc, Neu5,7Ac₂, Neu5,8Ac₂ bulunmuştur. Bunun dışında eser düzeyde Neu5GcS ve Neu5AcS ile ifade edilen sülfat grubu taşıyan sialik asitler bulunmuştur.

3) Jel kılıf glikoproteinlerinde glikomik yaklaşımla belirlenen N- ve O-glikanlara ilişkin sonuçlara göre; Glikomik yaklaşımla belirlenen glikanlar çizelgelerde ayrı ayrı özetlenmiştir. Yumurta jel kılıfında yüksek mannoz N-glikan ve O-heksoz tipinde O-glikanlar bulunmuştur. Ayrıca çekirdek 1-8 yapıya benzer O-glikanlar da LC-MSⁿ sisteminde bulunmuştur. MALDI-TOF sisteminde de çekirdek 1-8 yapısı bulunabilmiştir.

5. TARTIŞMA

Protein glikozilasyonu, ökaryotik hücrelerin proteinlerinin çoğunda gözlenen bir post-translasyonel modifikasyondur (Schauer, 2004). Glikokonjugatların (glikoproteinler, proteoglikanlar veya glikolipitler) bileşimindeki glikanlar bütün hücrelerde bulunurlar (Furukawa and Kobata, 1992; Hart, 1992; Lis and Sharon, 1993; Hölemann and Seeberger, 2004). Hücre içinde, sitoplazmada ya da organellerde, hücre zarlarında ve hücreler arası alanlar ile sıvılarında bulunabilirler (Varki, 1993). Glikan motifleri, yapısal proteinler, enzimler, taşıma proteinleri, hormonlar, immunoglobulinler, hücre adezyon molekülleri, toksin ve lektinlerin yapılarında da yer alırlar. (Varki, 1993). Hücre yüzey karbohidratları bir taraftan hücre-hücre, hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimi, sinyal iletimi ve konak-patojen etkileşimi (Crocker and Feizi, 1996; Solis et al., 2001; Kilpatrick, 2002; Gabius, 2004) gibi olayları yönlendirirken, diğer taraftan fertilizasyon (Rosati et al., 2000) ve gelişimde önemli roller oynar (Dennis et al., 1999; Rudd et al., 2001).

Sperm ve yumurta etkileşiminde yüzey karbohidrat içerikleri büyük önem taşımaktadır. Memelilerde zona pellucida adı verilen ve oogenez sırasında oluşan, sülfatlanmış glikoproteinlerden meydana gelen bir ekstrasellüler matriks tabakası bulunmaktadır. Bu tabakadaki üç glikoproteinin şeker zincirleri, yumurta-sperm etkileşiminde iş görmektedir. Omurgalılarıdaki gamet tanıma molekülleri korunmuş olmasına rağmen, bunların homologları derisidikenlilerde henüz keşfedilmiş değildir (Mengerink and Vacquier 2001). Denizkestanesi yumurtasını saran jelatin tabakada da karbohidratça zengin glikoproteinler bulunmaktadır (Isaka et al., 1970; SeGall and Lennarz, 1979; Foltz and Lennarz, 1993). Örneğin, denizkestanesi sperm membranındaki bir glikoprotein yumurta jelatin kılıfı için reseptördür (REJ) ve bir memeli sperm reseptörüyle homologtur. REJ'in testise spesifik memeli homoloğu olan PKDREJ'in fonksiyonu ise henüz bilinmemektedir (Huges et al., 1999).

Aralarında *Paracentrotus lividus*'un da bulunduğu sekiz farklı denizkestanesi türünde, jel kılıfın % 20-25 protein-peptit ve % 75-80 oranında polisakkarit içerdiği ve sülfatlı glikanların bulunduğu bildirilmiştir (Vasseur, 1948). Literatürde yumurta jel kılıfının yapısal özelliklerine ilişkin bildirimlerde

bulunmuş, *H. pulcherrimus* tür denizkestanesi yumurta jel kılıfında en fazla 0,1 mg/mL protein bulunduğu bildirilmiş, jel kılıfı bileşenleri “yoğun glikozillenmiş protein” ve “düşük moleküler ağırlıklı yoğun glikozillenmiş protein” olarak sınıflandırılmış ve incelenmiştir (Shimizu et al., 1990; Krapf et al., 2006). Bizim çalışmamızda da jel kılıfın protein miktarı Bradford metoduyla (Bradford, 1976) hesaplanmış ve jel kılıfta protein-peptit oranının oldukça düşük olduğu (0,53 µg/mg) bulunmuştur. Buna paralel olarak SDS-PAGE ile de oldukça zayıf ışıklı bantlar elde edilmesi, jel kılıf proteinlerinin karbohidratça zengin bileşime sahip olduğunu doğrulamaktadır.

Denizkestanesi türlerinden *Strongylocentrotus purpuratus*'da fertilizasyonu inhibe ettiği bildirilen 350 kDa ağırlığında bir (Ohlendieck et al., 1993), *H. Pulcherrimus*'da 237 kDa ve 258 kDa ve 120 kDa ağırlığında üç jel kılıf glikoproteini tespit edilmiştir. Bu çalışmada *P.lividus*'ta ~250 kDa, ~35 kDa ve ~10 kDa boyutlarında belirlediğimiz üç glikoproteinden sadece bir tanesinin *H. Pulcherrimus* ile benzer ağırlığa sahip olması, yumurta jel kılıf glikoproteinlerinin türler arasında oldukça farklı olduğunu işaret eder. Jel kılıfın döllenmedeki önemi dikkate alındığında, bu farklılıkların aynı ortamda olmasına karşın birbirini dölemeyen türler için ne kadar özel olduklarını gösterir.

P.lividus yumurta jel kılıfı glikan yapılarının aydınlatılması amacıyla yapılan bu çalışmada, öncelikle glikan zincirlerini oluşturan **monosakkaritlerin** belirlenmesi hedeflenmiştir. Monosakkaritler için önceki çalışmalara bakıldığında fukoz sülfat glikokonjugatlar, 2-O sülfatlı fukoz ile 4-O sülfatlı fukoz (α -L-fukan), 2-sülfatlı β -galaktan ile sülfatlı olmayan 3-O bağlı galaktan yapıları ve sialik asit tespit edilmiştir. (Shimizu et al., 1990; Silva et al., 1999; Yamaguchi et al., 1989; Kitazume et al., 1994; Muraao et al., 1999). *P.depresus* türünde fukopiranozil(1→4)glikolil nöraminik asit tip disakkarit varlığına dikkat çekilmiştir. Memelilerde fukoz ve sialik asidin terminal şeker olduğu bilinmekle beraber bu organizmada yeri soru işareti olarak kalmıştır (Hotta et al., 1973). Dört farklı denizkestanesi türü yumurta jel kılıfında ise ortalama %25 fukoz, %25 protein, %15 sülfat, %15 sialik asit ve %2 heksozamin içerdiği tespit edilmiştir (Segall, 1979). *Glyptocidoris crenularis* yumurta jel kılıfında ise sülfatlanmış β -D-galaktan yapıda şekerler tespit edilmiş ve tekrarlı biçimde (3- β -D-Galp-2(OSO₃)-1→3- β -D-Galp-1)*n* bulunmuştur (Castro et al., 2009). Monosakkarit

profiline ilişkin olmayan bu çalışmalarda jel kılıfta yüksek miktarda fukoz ve galaktozun var olduğu bildirilmiştir.

P.lividus yumurta jel kılıfında yoğun miktarda fukoz ve sialik asit (Neu5Ac) bulunduğu kağıt kromatografisi ile belirlenmiştir (Immers et al., 1968). *H. pulcherrimus* tür denizkestanesi yumurta jel kılıfında %87 Neu5Gc ve %13 Neu5GcS bulunduğu, *S. purpuratus* türünde ise %98 Neu5Gc ve %2 Neu5GcS bulunduğu bildirilmiştir. (Shimizu et al., 1990; Miyata et al., 2004; Yamakawa et al., 2007; Yamaguchi et al., 1989; Yamakawa et al., 2007; Coşkun et al., 2011) *Pseudocentrotus depressus* tür denizkestanesi yumurta jel kılıfında bunların yanında N-asetoglikolil-4-metil-4,9-dideoksi nöraminik asit de bulgular arasındadır (Hotta et al., 1970).

Pseudocentrotus depressus tür denizkestanesi yumurta jel kılıfında kalorimetrik analizler sonucunda 1:1 oranında fukoz:glikolil nöraminik asit bulunmuştur. C8 ve C9 karbonunda hidroksil gruplarının süstitüye olmadıkları belirtilmiştir. Neu5Gc tip sialik asidin C4 hidroksil grubuna fukoz bağlı olduğu belirtilmiştir. Memelilerde fukoz ve sialik asidin terminal şeker olduğu bilinmekle beraber bu organizmada yeri soru işareti olarak kalmıştır (Hotta et al., 1973) *Glyptocidoris crenularis* yumurta jel kılıfında sülfatlı (polimerik galaktoz) yapısı tespit edilmiştir. 2-sülfatlı β -galaktan ile sülfatlı olmayan 3-bağlı galaktan gözlenmiştir. Bunun yanında ekinoderm yumurta jel kılıfta ortak gözlenen sialoglikoproteinler bu türde **bulunmamıştır** (Castro et al., 2009). *H. pulcherrimus* türünde O-bağlı oligosakkaritlerin terminal birimine poliNeu5Gc zincirinin ekli olduğu bildirilmiştir. Polisialik asit biriminin fertilizasyonda rol aldığı ifade edilmiş ve bunun Ca^{++} iyonuyla işbirliği içinde gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Kitazume et al., 1994).

Bu tez çalışmasında ise *P.lividus* jel kılıfında mannoz, N-asetilglukozamin, glukoz, N-asetilgalaktozamin, galaktoz, arabinoz+ksiloz ve fukoz tespit edilmiştir. **Fukozun** tüm şekerler içinde en fazla miktarda bulunması, sadece N- ve O-glikan yapılarında fukoz molekülünün bu kadar bol miktarda bulunma olasılığı düşük olduğundan, jel kılıf üzerinde polimerik fukoz biçiminde bulunduğunu düşündürmektedir. **Mannoz**, fukozdan sonra en çok bulunan 2. monosakkarit olup literatürde bu şekerin jel kılıftaki varlığı ile ilgili yeterli bilgi

bulunamamıştır. Bunun yüksek mannoz N-glikanlarla ilişkili olduğu söylenebilir. Üçüncü seviyede en çok bulunan **arabinoz** ve **ksiloz** ikilisi ayrı ayrı analiz edilemediğinden tek pik olarak elde edilmiştir. Bu şekerlerden arabinoz için jel kılıftaki fonksiyonel niteliğine ilişkin bilgi bulunamamıştır. Ksiloz, GAG yapılarında (kondroitin sülfat, dermatan sülfat ve heparan sülfat) aminoasite bağlanan ilk monosakkarit olarak bilinir (Taylor and Drickamer, 2006). Proteoglikan yapıda olduğu varsayılan yumurta jel kılıfta ksilozun varlığı bu biçimde anlamlıdır. Ancak, *P.lividus* sölomik sıvısı içinde 13 kDa boyutunda bir proteinin L-Ramnoz and D-Arabinozu tanıyan bir lektinin varlığı da belirlenmiştir (Drago et al., 2009). Yine, denizkestanesi yumurta ve embriyosundan elde edilen fukoz polimer yapının antitümör niteliği üzerine yapılan patent çalışmasında proteoglikan yapıda ksiloz monosakkaritinin varlığına işaret edilmiştir (Misevic, 2009). Ayrıca denizyıldızı yumurta jel kılıfı glikan yapılarında fukoz zincirinin terminalinde ksiloz bulunduğu bildirilmiştir (Hoshi et al., 2012). Dördüncü seviyede miktarı yüksek olan **galaktoz** için de polimerik yapı olasılığı bulunmaktadır. Galaktoz aynı zamanda O-glikan çekirdek yapısında bulunması gereken monosakkaritlerden biri olduğu için yumurta jel kılıfta O-glikan varlığını da işaret etmektedir. Galaktoz ve N-asetilgalaktozamin O-glikan yapıtaş olmalarıyla beraber glikozaminoglikan (GAG) biyosentezinde de yer alır. Ancak N-asetilgalaktozamin galaktoza göre daha düşük düzeyde bulunduğundan GAG yerine O-glikan veya galaktan formunda bulunduğu düşünülmektedir. **Sialik asit**'de bir monosakkarit olup glikan yapılarında terminal şeker olarak bulunur veya polimerik biçimde uzun zincirli yapıda olabilir. Sialik asitlerin hidroksil grupları üzerindeki modifikasyonlarının analiz edilebilmesi için monosakkarit analizlerinden farklı kimyasallar ve koşullar kullanılır. *P. lividus* yumurta jel kılıfında LC-MS/MS ile 12 farklı sialik asit (Yeşilyurt et al., 2014) belirlemiş olmamıza karşın, bu tez çalışmasında sekiz tipini belirleyebilmemiz, izolasyon aşamasında diyaliz ve liyofilizasyon yöntemlerinin ilave edilmesi ile ilgilidir ve sialik asitlerin analiz sonrası sülfat grubu taşıyan yapıların miktarının azalması ve iki asetilli yapının tespit edilememesinden kaynaklanmaktadır. Sialik asit analizi sonucunda yumurta jel kılıfında Neu5Gc tip sialik asitin diğer çeşitlere göre çok yüksek miktarda olduğu görülmüştür. Neu5Gc/Neu5Ac oranı hesaplandığında Neu5Gc'nin 44 kat fazla olduğu görülmektedir. Bu analizde ayrıca, çok az miktarda da olsa Neu5AcS ve Neu5GcS olarak ifade edilen sülfatlı

sialik asitler de tespit edilmiştir. Neu5Gc ve Neu5Ac molekülünün C-7-8-9 nolu hidroksil gruplarının birer asetil grubu taşıdığı tespit edilmiştir. Fakat asetilli sialik asit türlerinin miktarlarının Neu5Gc yanında çok düşük olduğu pik alanlarından anlaşılmaktadır. Buna ek olarak Neu5Gc molekülünün 9-O-asetilli tipi olan Neu5Gc9Ac termodinamik açıdan en kararlı yapı olup Neu5Ac tip sialik asit ile yaklaşık aynı miktardadır. Dolayısıyla Neu5Ac'nin standart kabul edildiği bazı analizlerin yanıltıcı olacağı anlaşılmaktadır. *P.lividus* yumurta jel kılıfında baskın tip sialik asit Neu5Gc olup daha çok polimerik yapıda olduğu tahmin edilmektedir. Polisialik asitlerin yumurta jel kılıfında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Balık yumurta jel kılıfında bulunan polisialik asitler embriyonik NCAM fonksiyonunda ve sodyum kanal proteinlerinde önemli görevler üstlenirler (Varki and Lowe, 2009).

Glikoproteinlerin glikozilasyon profilleri, işlevleri üzerinde doğrudan etkilidir. İnsan genom projesiyle beklenenin çok altında gen bölgesinin belirlenmesi, translasyon sonrası modifikasyonların önemini gündeme getirmiştir. Translasyon sonrası modifikasyonlar çok çeşitli olup, bunlardan biri de glikozilasyondur. Glikanlarla ilgili verilerin toplandığı yeni bir alan olan glikobiyoloji ve glikoteknolojide kullanılan **glikom** terimi, tek bir organizmada üretilen tüm glikan serisi anlamına gelmektedir.

Glikomik analizler genelde, incelenen biyolojik materyalin glikozilasyon potansiyelini ortaya çıkarmayı amaçlar. Kütle spektrometrisi ile bu alanda oldukça fazla avantaj elde edilebilmektedir (Guérardel et al., 2006). Glikomiks, proteomiksin uzantısı gibi görülmemelidir. Glikomiks de proteomiks gibi belirli bir biyolojik örnekteki spesifik moleküler yapıların ortaya çıkarılmasını amaçlar. Dallanmış glikanların yapılarının analizi amacıyla yeni analitik teknikler ve bilgisayar destekli sistemler kullanılmalıdır (York et al, 2014).

Bazı memeli türlerinde analitik çalışmalar yapılmış ve glikan profili karakterize edilmiştir. Kemirgen yumurtasını kaplayan özel tabakanın (Zona Pellucida, ZP) yüksek mannoz, kompleks N-glikan ve çekirdek-2 tip O-glikan yapılarını taşıdığı bildirilmiştir (Dell et al., 1999). Bazı memelilere ait ZP glikoprotein yapılarının benzerliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada, şapkalı maymunların (bonnet) %94 civarında insan ZP ile benzerlik gösterdiği, tavşan ile

%70 civarında benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Dunbar et al., 2000). Sığır (bovine) yumurtası ZP glikan analitiği çalışmalarında yüksek mannoz yapı tespit edilmiştir. Bu yapının sperm ligand aktivitesi için önemli olduğu belirlenmiştir (Nakano et al., 1996; 2001).

Birçok türün yumurta jel kılıfının glikan yapısı aydınlatılmak üzere çalışılmıştır. Kurbağa, domuz, sığır gibi bazı canlıların yumurta kılıflarının glikomik tekniklerle analizleri yapılmış ve oldukça değişik sonuçlar elde edilmiştir. *Xenopus laevis*'e ait yumurta jel kılıfında MALDI-FT-MS ve H-NMR sistemiyle birçok nötral ve asidik oligosakkaritler belirlenmiştir (Lebrilla, 1997, 2001; Boilly, 1995). Yine aynı türde polimorfik özelliklere bağlı olarak farklı glikan yapıları yumurta jel kılıfı glikanlarında tespit edilmiştir (Strecker et al., 2000). *Xenopus borealis* türü kurbağa yumurta jel kılıfında glikomik teknikler ile O-bağlı oligosakkaritlerin yapı analizi MALDI-IRMPD ve ekzoglikozidazlar kullanılarak aydınlatılmıştır (Li et al., 2011). *Bufo arenum* türü kurbağa yumurta jel kılıfında en fazla galaktoz olmakla beraber fukoz, N-asetilglukozamin ve N-asetilgalaktozamin tespit edilmiştir. Bunun yanında sadece Neu5Ac tip sialik asit de spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir ve mannoz bulunmadığı bildirilmiştir. Yoğun biçimde O-glikan varlığı işaret edilmiş, N-glikanların tespit edilemediği bildirilmiştir (Cabada et al., 1997).

Çeşitli denizkeşanesi türlerinin yumurta jel kılıflarında daha çok akrozom reaksiyonunu başlatan veya reseptör görevi gören proteinler üzerine yoğunlaşmış ve birtakım yöntemlerle bu proteinler karakterize edilmiştir. Fakat kütle spektrometrisi ve bilgisayar destekli glikomik yaklaşımla jel kılıf glikan yapıları profili belirlenmemiştir. Kütle spektrometrik ve bilgisayar destekli glikomik tekniklerle *P.lividus* yumurta jel kılıfı N-glikan ve O-glikan yapılarına ilişkin literatürde herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Deniz canlılarının glikan yapılarına ilişkin glikomik yaklaşımla elde edilen verilerin literatürde yeni olduğu bildirilmiştir (Pomin, 2011).

Bu çalışmada, yeni ve modern glikomik tekniklerden olan MALDI-TOF/MS, LC-ESI-MS/MS, lektin blotting sistemleri yanında bilgisayar programları da kullanılarak *P.lividus* yumurta jel kılıfı glikan profili ilk defa ortaya çıkarılmıştır.

Çalışmamızda, **N-glikan analizi** ile sadece yüksek mannoz (oligomannoz) tip yapılar tespit edilmiştir. Hibrit tip N-glikanlara ait veri sadece MALDI-TOF sisteminde m/z 2152 iyonuna ait 6GlcNAc3Man yapısı biçiminde tespit edilmiştir. Fakat bu oligosakkarit yığını LC-ESI-MS/MS sisteminde bulunamamıştır. Dolayısıyla N-glikanları genel olarak yüksek mannoz olarak belirtmek yerinde olacaktır. N-glikanlar 2GlcNAc3Man yapısından başlayarak 2GlcNAc9Man yapısına kadar farklı düzeylerde tespit edilmiştir. Dallanma yapıları LC-ESI-MS/MS ve Glycoworkbench programı kullanılarak ortaya çıkarılmış ve yüksek omurgalılar benzeri yapıda olduğu anlaşılmıştır. Monosakkarit analizlerinde gözlenen fukoz veya sialik asite N-glikan yapılarında rastlanmamıştır. Bu analizde PNGaseF enzimi kullanılmıştır. N-glikanlarda çekirdek yapıda yeralan GlcNAc molekülüne bağlı α 1–6 bağlı fukoz bu enzim sayesinde tespit edilebilmektedir. Ancak α 1–3 bağlı fukoz sadece PNGase A enzimi ile serbest kalabilmektedir (Stanley et al., 2009).

S. purpuratus türü denizkestanesinde yumurta jel katmanına N-glikanları aminoasit bağlantı noktasından kesen PNGaseF enzimi uygulandığında akrozom reaksiyonunun gerçekleşmediği bildirilmiştir. Enzim ürününün karbohidrat yapıda olduğu test edilmiş ve akrozom reaksiyonundan N-glikozilasyonun sorumlu olduğu belirlenmiştir (Keller et al., 1994). Bunun dışında denizkestanesi yumurta jel kılıfı N-glikanlarına ilişkin veri bulunamamıştır. Buna benzer biçimde sığırdada döllenmede sperm-yumurta bağlantısını yüksek mannoz N-glikan yapılarının rol oynadığı tespit edilmiştir (Amari et al., 2001).

Akrozom reaksiyonlarında O-glikanların da çok önemli olduğu bilinmektedir. Bütün O-glikan çeşitlerini protein zincirinden koparabilecek evrensel bir enzim bulunmamaktadır (Jensen et al., 2010). Dolayısıyla O-glikanlar kimyasal reaktifler kullanılarak serbest bırakılır. Bunun bilinen metodu bazik ortamda β -eliminasyon ile indirgeme reaksiyonudur (Carlson and Blackwell, 1968). Benzer biçimde yine hidrazin kullanılarak indirgen olmayan β -eliminasyonu ile O ve N-glikanlar koparılabilmektedir (Patel et al., 1993).

Bu tez çalışmasında β -eliminasyon indirgeme ile **O-glikan analizi** yapılmış ve sadece çekirdek1 (core1) yapısında ve T-antijen olarak da adlandırılan yapı MALDI-TOF sisteminde gözlenebilmiştir.

β -eliminasyon indirgeme ile O-glikan analizinin yanında daha fazla sonuç elde edebilmek amacıyla bir başka teknik ile de O-glikan analiz yapılmıştır. Bu yöntemde indirgen olmayan β -eliminasyonu sayesinde glikan yığınlarının proteine bağlı olan kısmına, glikan yığınları serbest bırakıldıktan sonra floresan bir reaktif bağlanabileceği bildirilmiştir (Zauner et al., 2012).

Bu çalışmada PMP reaktifi ile serbest bırakılan O-glikanlar reaksiyona girmiş ve floresan işaretlenmiştir. Bu sayede LC-MS iyonizasyon hassasiyeti artırılmış ve O-glikanların daha verimli tanımlanması sağlanmıştır. Böylece, düz zincir yapıda veya dallanmış yapıda heksoz dizileri tespit edilmiştir. En fazla dört heksozun birbirine bağlı olduğu zincir yapı gözlenmiştir. Heksozun doğrudan proteine bağlı olduğu varsayılmaktadır. Dolayısıyla O-heksoz tipinde yapının olma olasılığı bulunmaktadır. Bu durum ancak ekzoglikosidazlar kullanılarak aydınlatılabilmektedir. Ayrıca bir heksozamine bağlı heksoz dizisi de tespit edilmiştir. Çekirdek 1 yapıya benzer O-glikan olan bu yapıdaki heksoz ve heksozaminler tanımlanamamıştır. Fakat bu yapının trypomastigot hücrelerinden elde edilen glikokonjugatların analizi sonrası bulunan Gal1,3Gal1,4GlcNAcol yapıya (Almeida et al., 1994) benzer olması ilgi çekicidir. Mimmivirüs üzerinde yeni tanımlanan ve indirgen uçta glukoz bulunan 3 heksoz ve 4 heksoz zincir yapı da benzer biçimdedir (Hülsmeier and Hennem, 2014). Bu yapılar musin tip O-glikozilasyon çekirdek yapılarının dışında kalan biçimlerdir. Ayrıca galaktosialidosis hastalarından alınan idrar ve amniyon sıvılarında da yeni tespit edilen benzer heksoz yapılar bulunmuştur (Bruggink et al., 2010).

Yumurta jel kılıfının glikan yapıları ortaya çıkarılan diğer canlılar ile bu çalışmada elde edilen bulgular karşılaştırıldığında; fertilizasyon çalışmalarında sıkça kullanılan ve model organizma olarak da kabul edilen denizkestanesinin glikan profili farklılık göstermektedir. Domuz, kurbağa ve farede N-glikanlar hibrit ve kompleks yapıda bulunmuşken, O-glikanlar da oldukça zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Oysa *P.lividus*'ta sadece yüksek mannoz N-glikan bulunmuştur. O-glikanların çeşitliliği oldukça düşük olup musin-tip değildir. N- ve O-glikanlar üzerinde fukoz ve sialik asite rastlanmamıştır. Literatürde fukoz ve sialik asitin polimerik yapıda olduğu bildirilmiştir. Pozitif örnek olarak kullanılan fetuin ve fare karaciğerinde N ve O-glikan yapıları literatürde belirtildiği gibi bulunmuştur.

Sonuç olarak; bu çalışmada model organizma olarak kullanılan denizkestanesi yumurta jel kılıfı glikan yapısının glikomik yaklaşımla çözümlenmesi amaçlanmıştır. Evrim sürecinde *P.lividus* tür deniz kestanesinin diğer türlere göre değişmeksizin günümüze kadar yaşamını sürdürdüğünü gösteren çalışmalar (Lee et al., 2003) bu türün özel yapısını ortaya koymaktadır. Bu sayede sadece fertilizasyon değil, onun da ötesinde türleşmenin de moleküler açıklamalarına özellikle glikobiyolojik açıdan cevapların bulunabilmesi ilgi çekicidir. Model organizmada belirlenen detaylar anlaşıldıktan sonra diğer canlılarda da homolog moleküllere bakış açısı etkilenebilir. Bu bağlantıların iyi bilinmesi insanlarda infertilitenin araştırılmasına ve çözülmesine de katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alley, W. R. and Novotny, M. V.**, 2013, Structural Glycomic Analyses at High Sensitivity: A Decade of Progress, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 6:237–65pp.
- Almeida, I. C., Ferguson, M. A. J., Schenkman S. and Travassos, L. R.**, 1994, Lytic anti-x-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*, *Biochem. J.*, 304, 793-80pp.
- Amari, S., Yonezawa, N., Mitsui, S., Katsumata, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Takeda, Y. and Nakano, M.**, 2001, Essential role of the nonreducing terminal α -mannosyl residues of the n-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding, *Molecular Reproduction and Development*, 59:221-226pp.
- Arranz, S. E., Albertali, I. E., and Cabada, M. O.**, 1997, Bufo arenarum egg jelly coat : purification and characterization of two highly glycosylated proteins, *Biochem. J.*, 323, 307-312pp.
- Basics of LC/MS**, 2001, Agilent Technologies, 5988-2045EN, 36p (<http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf>)
- Bause, E. and Legler, G.**, 1981, The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis. *Biochem J.*, 195(3): p. 639-44pp.
- Bause, E.**, 1983, Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J.*, 209:331–336pp.
- Bollag, M., Rozycki, M.D. and Edelstein, S.J.**, 1996, Protein Methods Second Edition, *Wiley-Liss Inc.*, 416pp.
- 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.
- Bruggink, C., Poorthuis, B. J. H. M., Piraud, M., Froissart, R., Deelder, A. M. and Wuhrer, M.**, 2010, Glycan profiling of urine, amniotic fluid and ascitic fluid from galactosialidosis patients reveals novel oligosaccharides with reducing end hexose and aldohexonic acid residues, *FEBS Journal*, 277, 2970–2986pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Carlson, D. M. and Blackwell, C.,** 1968, Structures and Immunochemical Properties of Oligosaccharides Isolated from Pig Submaxillary Mucins, *J. Biol. Chem.* Vol.243: 616-626pp.
- Castro, M. O., Pomin, V. H., Santos, L. L., Vilela-Silva, A-C. E. S., Hirohashi, N., Pol-Fachin, L., Verli, H. and Mourão, P. A. S.,** 2009, A unique 2-sulfated {beta}-galactan from the egg jelly of the sea urchin *Glyptocidaris crenularis*: conformation flexibility versus induction of the sperm acrosome reaction, *J. Biol. Chem.*, Jul 29;284(28):18790-800pp.
- Ceroni, A., Maass, K., Geyer, H., Geyer, R., Dell, A. and Haslam, S. M.,** 2008, GlycoWorkbench: A Tool for the Computer-Assisted Annotation of Mass Spectra of Glycans, *Journal of Proteome Research*, 7, 1650–1659pp.
- Chavan, M. and Lennarz, W.,** 2006, The molecular basis of coupling of translocation and N-glycosylation, *Trends Biochem Sci*, 31:17–20pp.
- Clark, G. F.,** 2013, The role of carbohydrate recognition during human sperm–egg binding, *Human Reproduction*, Vol.28, No.3, 566–577pp.
- Crocker, R. P. and Feizi T.,** 1996, Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions, *Current Opinion in Structural Biology*, Vol 6, Issue 5, 679–691pp.
- Dağcı, H. ve Erdoğan, D. D. ,** 2011, Protein Ölçüm Testleri, 415- 426, Parazitolojide Laboratuvar, Korkmaz, M. ve Ok, Ü.Z. (Derl), Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın no: 23, META Basım, İzmir, 470s
- Dell, A. and Morris, H. R.,** 2001, Glycoprotein Structure Determination by Mass Spectrometry, *Science*, 291, 2351-2356pp.
- 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.
- Domon, B. and Costello, C. E.,** 1988, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconj J.*, 5:397–409pp.
- Drago, F., Malagoli, D., Pezzino, F. M., D’Urso, V. and Sammartano, F.,** 2009, Presence of a low molecular weight lectin in the coelomic fluid of the sea urchin *Paracentrotus lividus* , *Invertebrate Survival Journal*, vol6: 15-20pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Du, J., Meledeo, A. M., Wang, Z., Khanna, H. S., Paruchuri, V. D. P. and Yarema, K. J.,** 2009, Metabolic glycoengineering: Sialic acid and beyond, *Glycobiology*, 19(12):1382–1401pp.
- Dwek, R.A.,** 1996, Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* 96, 683–720pp.
- Easton, R. L., Patankar, M. S., Lattanzio, F. A., Leaven, T. H., Morris, H. R., Clark, G. F. and Dell, A.,** 2000, Structural Analysis of Murine Zona Pellucida Glycans, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 11, 7731–7742pp.
- Ellgaard, L and Helenius, A.,** 2001, ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:431–437pp.
- Fenn, J.,** 1989, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*,. 246, 4926, 64-71pp.
- Fischer, W., M.-L. Bauchot et M. Schneider (rédacteurs),** 1987, Fiches FAO d'identifications des espèces pour les besoins de la pêche. (Revision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume I. Végétaux et Invertébrés. Publication préparée par la FAO, résultat d'un accord entre la FAO et la Commission des Communautés Européennes (Projet GCP / INT / 422 / EEC) financée conjointement par ces deux organisations, Rome, FAO, Vol. 1, 727pp.
- Fukuda, M. and Kobata, A.,** 1993, Glycobiology: a practical approach, IRL Press at Oxford University Press, 401pp.
- Furukawa, J., Fujitani, N., Araki, K., Takegawa, Y., Kodama, K. and Shinohara, Y.,** 2011, Versatile Method for Analysis of Serine/Threonine Posttranslational Modifications by β -Elimination in the Presence of Pyrazolone Analogues, *Anal. Chem.*, 83, 9060–9067pp.
- Furukawa, K. Kobata, A.,** 1992, Protein glycosylation, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 3, 554–559pp.
- Gabius, H. J., Siebert, H. C., Andre, S., Jimenez-Barbero, J. and Rudiger, H.,** 2004, Chemical biology of the sugar code, *Chembiochem*. 5(6):740-64pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gagneux, P. and Varki, A.,** 1999, Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function, *Glycobiology*, vol.9, no.8, 747–755pp.
- Gaskell, S.J.,** 1997, Electrospray: Principles and practice, *Journal of Mass Spectrometry*,. 32(7), 677-688pp.
- Gill, D. J., Clausen, H. and Bard, F.,** 2011, Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends Cell Biol*, 21(3): 149-58pp.
- Guerardel, Y., Chang, L.-Y., Maes, E., Huang, C.-J. and Khoo, K.-H.,** 2006, Glycomic survey mapping of zebrafish identifies unique sialylation pattern, *Glycobiology*, vol. 16, no. 3, 244–257pp.
- Guerardel, Y., Kol, O., Maes, E., Lefebvre, T., Boilly, B., Davril, M. and Strecker, G.,** 2000, O-glycan variability of egg-jelly mucins from *Xenopus laevis* :characterization of four phenotypes that differ by the terminal glycosylation of their mucins, *Biochem. J.*, 352, 449-463pp.
- Hager, J. W. and Yves Le Blanc, J. C.,** 2003, Product ion scanning using a Q-q-Q linear ion trap (Q TRAP™) mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 1056pp.
- Haltiwanger, R. S. and Feizi, T.,** 2011, Glycobiology: the study of the sweet life, *Current Opinion in Structural Biology*, 21:573–575pp.
- Ham, M., Koning, T. J., Lefeber, D., Fleer, A., Prinsen, B. H. C. M. T. and Velden, M. G. M. S.,** 2010, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the quantification of free and total sialic acid in human cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B*, 878, 1098pp.
- Ham, M., Prinsen, B. H. C. M. T., Huijmans, J. G. M., Abeling, N. G. G. M., Dorland, B., Berger, R., Koning, T. J. and Velden, M. G. M. S.,** 2007, Quantification of free and total sialic acid excretion by LC–MS/MS, *Journal of Chromatography B*, 848, 251pp.
- Hara, S., Yamaguchi, M., Takemori, Y., Furuhashi, K., Ogura, H. and Nakamura, M.,** 1989 Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.*, 179, 162-166pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harazono, A., Kobayashi, T., Kawasaki, N., Itoh, S., Tada, M., Hashii, N., Ishii, A., Arato, T., Yanagihara, S., Yagi, Y., Koga, A., Tsuda, Y., Kimura, M., Sakita, M., Kitamura, S., Yamaguchi, H., Mimura, H., Murata, Y., Hamazume, Y., Sato, T., Natsuka, S., Kakehi, K., Kinoshita, M, Watanabe, S. and Yamaguchi, T.,** 2011, A comparative study of monosaccharide composition analysis as a carbohydrate test for biopharmaceuticals, *Biologicals*, 39:171-180pp.
- Hart, G. W.,** 1992, Glycosilation, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4(6), 1017-23pp.
- Harvey, D. J.,** 2000, Collision-induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray., *J. Mass Spectrom.*, 35, 1178pp.
- Hashii, N., Kawasaki, N., Nakajima, Y., Toyoda, M., Katagiri, Y., Itoh, S., Harazono, A., Umezawa, A. and Yamaguchi, T.,** 2007, Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J. Chromatogr A.*, 10, 263pp.
- Haverkamp, J., Halbeek, V., H., Dorland, L., Vliegthart, J., F., G., Pfeil, R. and Schauer, R.,** 1982, High-Resolution ¹H-NMR Spectroscopy of Free and Glycosidically Linked O-Acetylated Sialic Acids. *Eur J Biochem*, 122, 305pp.
- Helenius, A. and Aebi, M.,** 2001, Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291:2364–2369pp.
- Higgins, E.,** 2010, Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic, *Glycoconj J.*, 27(2): 211–225pp.
- Honda, S., Suzuki, S. and Taga, A.,** 2003, Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 1689-1714pp.
- Hoshi, M., Moriyama, H. and Matsumoto, M.,** 2012, Structure of acrosome reaction-inducing substance in the jelly coat of starfish eggs: A mini review, *Biochemical and Biophysical Research Communications* , Vol 425, Issue 3, 595–598pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hotta, K. and Kurokawa, M.,** 1973, A Novel Sialic Acid and Fucose-containing Disaccharide Isolated from the Jelly Coat of Sea Urchin Eggs, *The Journal of Biological Chemistry*, 248(2): 629-631pp.
- Hotta, K., Kurokawa, M. and Isaka, S.,** 1970, Isolation and Identification of Two Sialic Acids from the Jelly Coat of Sea Urchin Eggs, *The Journal of Biological Chemistry*, 245(23): 6307-6311pp.
- Hölemann, A. and Seeberger P. H.,** 2004, Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates, *Curr Opin Biotechnol.* Dec;15(6):615-22pp.
- Hughes, J., Ward, C. J., Aspinwall, R., Butler, R. And Harris, P. C.,** 1999, Identification of a human homologue of the sea urchin receptor for egg jelly: a polycystic kidney disease-like protein. *Hum. Molec. Genet.* 8: 543-549pp.
- Hülsmeier, A. J. and Hennet, T.,** 2014, O-linked glycosylation in Acanthamoeba polyphaga mimivirus, *Glycobiology.*, Aug;24(8):703-14pp.
- Immers, J.,** N-Acetyl-Neuramic Acid in the Sea Urchin Jelly Coat, 1968, *Acta Chem. Scand.*, 22(6):2046-2048pp.
- Jensen, P. H., Kolarich, D. and Packer, N. H.,** 2010, Mucin-type O-glycosylation--putting the pieces together. *FEBS J.*, 277(1):81-94pp.
- Kamerling, P. J., Schauer, R., Vliegthart, G. F. J. and Hotta, K.,**1980, Identification of the sialic acids from the egg jelly coat of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus* (Okayama), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361:1511-1516pp.
- Kamerling, J. and Gerwig, G. J.,** 2007, Structural analysis of naturally occurring sialic acids. In: Inka Brockhausen editor. *Methods in Molecular Biology, Glycobiology Protocols. Humana Press.* 69-91pp.
- Katsumata, T., Noguchi, S., Yonezawa, N, Tanokura, M. and Nakano, M.,** 1996, Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs, *Eur. J. Biochem.* 240, 448-453pp.
- Kawaguchi, S. K., Inoue, S., Inoue, Y. and Lennarz, W. J.,** Identification of sulfated oligosialic acid units in the O-linked glycan of the sea urchin egg receptor for sperm, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:3650-3655pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Keller, S. H. and Vacquiart, V. D.**, N-Linked Oligosaccharides of Sea Urchin Egg Jelly Induce the Sperm Acrosome Reaction, 1994, *Develop. Growth & Differ.*, 36 (6): 551-556pp.
- Kiessling, L. L. and Splain, R. A.**, 2010, Chemical Approaches to Glycobiology, *Annu. Rev. Biochem.*, 79:619–53pp.
- Kilpatrick, D. C.**, Animal lectins: a historical introduction and overview, 2002, *Biochim Biophys Acta.* 1572(2-3):187-97pp.
- Kitazume, S., Kitajima, K., Inoueg, S., Troy, F. A., Cho, J.W., Lennarz, W. J. and Inoue, Y.**, 1994, Identification of Polysialic Acid-containing Glycoprotein the Jelly Coat of Sea Urchin Eggs, *The Journal of Biological Chemistry*, 269(36): 22712-22718pp.
- Kitazume, S., Kitajima, K., Inouei, S., Haslam, M. S., Morris, R. H., Dell, A., Lennarz, J. W. and Inoue, Y.**, 1996, The Occurrence of Novel 9-O-Sulfated N-lycolylneuraminic Acid-capped a235-Oglycolyl-linked Oligo/PolyNeu5Gc Chains in Sea Urchin Egg Cell Surface Glycoprotein, *The Journal of Biological Chemistry*, 271(12): 6694-6701pp.
- 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 SIA quinoxalines. *Glycobiology.*, 7, 421pp.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S.**, 1985, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, 54:631–664pp.
- Krapf, D., Vidal, M., Arranz, S. E. and Cabada, M. O.**, 2006, Characterization and biological properties of L-HGP, a glycoprotein from the amphibian oviduct with acrosome-stabilizing effects, *Biol. Cell* 98, 403–413pp.
- Lamari, F.-N. and Karamanos, N.-K.**, 2002, Separation methods for sialic acids and critical evaluation of their biologic relevance. *J. Chromatogr. B.* 5, 781 (1-2): 3-19pp.
- Lee, Y. H.**, 2003, Molecular Phylogenies and Divergence Times of Sea Urchin Species of Strongylocentrotidae, Echinoida, *Mol. Biol. Evol.* 20(8):1211–1221pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lehle, L., Strahl, S. and Tanner, W.**, 2006, Protein Glycosylation, Conserved from Yeast to Man: A Model Organism Helps Elucidate Congenital Human Diseases, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 6802 – 6818pp.
- Leymarie, N. and Zaia, J.**, 2012, Effective Use of Mass Spectrometry for Glycan and Glycopeptide Structural Analysis, *Anal. Chem.*, 84, 3040–3048pp.
- Li, B., Russell, S. C., Zhang, J., Hedrick, J. L. and Lebrilla, C. B.**, 2011, Structure determination by MALDI-IRMPD mass spectrometry and exoglycosidase digestions of O-linked oligosaccharides from *Xenopus borealis* egg jelly, *Glycobiology*, 21(7): 877–894pp.
- Li, O. M. Pomin, H. V., Santos, L. L., Vilela-Silva, A. E. S., Hirohashi, N., Pol-Fachin, L., Verli, H. and Mourao, P. A. S.**, A Unique 2-Sulfated Galactan from the Egg Jelly of the Sea Urchin *Glyptocidaris crenularis*, 2009, *The Journal of Biological Chemistry*, 284(28): 18790-18800pp.
- Lis, H. and Sharon, N.**, 1993, Protein glycosylation, *Eur. J. Biochem.*, 218, 1-27 173-199pp.
- Lopez, L. L., Tiller, P. R., Senko, M. W. and Schwartz, J. C.**, 1999, Automated Strategies for Obtaining Standardized Collisionally Induced Dissociation Spectra on a Benchtop Ion Trap Mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13, 663pp.
- Marino, K., Bones, J., Kattla, J. J. and Rudd, P. M.**, 2010, A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat. Chem. Bio.*, 6, 713-723pp.
- Marvina, L. F., Roberts, M. A. and Fay, L. B.**, 2003, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta* 337, 11 –21pp.
- McNaught, A. D. and Wilkinson, A.**, 1997, IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"), Blackwell Scientific Publications, Oxford, s1337
- McRae, G. and Monreal, C. M.**, 2011, LC-MS/MS quantitative analysis of reducing carbohydrates in soil solutions extracted from crop rhizospheres, *Anal Bioanal Chem*, 400:2205–2215pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mengerink, K. J. and Vacquier V.D.**, 2001 Glycobiology of sperm–egg interactions in deuterostomes, *Glycobiology* Vol.11:4, 37–43pp.
- Merry, A. H. and Astrautsova, A. S.**, 2009, Analysis of N- and O-glycans of glycoproteins by HPLC technology, 204-221, *Bioinformatics for Glycobiology and Glycomics*, Lieth, C. W., Lütteke, T. And Frank, M. (Eds), Wiley, West Sussex, 471pp.
- Misevic, G.**, 2009, Fucose containing proteoglycan or acidic glycan and their pharmaceutical use, Pub. No.: US 2009/0118230A 1
- Miyata, S., Sato, C., Kitamura, S., Toriyama, M. and Kitajima, K.**, 2004, A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an α 2,9-linked poly-N-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-O-sulfated sialic acid residue, *Glycobiology*, 14 (9) 827–840pp.
- Morelle, W. and Michalski, J-C.**, 2005, Glycomics and Mass Spectrometry, *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 11, No. 20, 2615-2645pp.
- Morelle, W. and Michalski, J-C.**, 2007, Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry, *Nature Protocols*, Vol.2, No.7, 1585-1602pp.
- 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.*, 15, 73, 5422pp.
- Ohlendieck, K, Dhume, S. T., Partin, J. S. and Lennarz, W. J.**, 1993, The sea urchin egg receptor for sperm: Isolation and characterization of the intact, biologically active receptor. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 122, 4, 887-895pp.
- Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Parekh, R. and Jaques, A.**, 1993, Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry*, 32 (2), 679–693pp.
- Pomin, V. H.**, 2011, Fucanome and Galactanome: Marine Glycomics Contribution, *J Glycobiol* Vol 1, Issue 1, 1-7pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Prasad, S.V., Skinner, S.M., Carino, C., Wang, N., Cartwright, J., Dunbar, B.S.**, 2000, structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona pellucida, *Cells Tissues Organs*, 166:148–164pp.
- Rademacher, T. W., Parekh, R. B. and Dwek, R. A.**, 1988, Glycobiology, *Ann. Rev. Biochem.*, 57:785-538pp.
- Rillahan, D. C and Paulson, J. C.**, Glycan Microarrays for Decoding the Glycome 2011, *Annu. Rev. Biochem.*80-797-823pp.
- Rosati, F., Capone, A., Giovampaola, C. D., Brettoni, C. And Focarelli, R.**, 2000, Sperm-egg interaction at fertilization: glycans as recognition signals. *Int J Dev Biol.* 44(6):609-18pp.
- Ruddock, L. W and Molinari, M.**, 2006, N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci*, 119:21,4373-80pp.
- Schauer, R.**, 1982, Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydrate.*, 40, 131pp.
- SeGall, G. K. and Lennarz, W. J.**, 1979, Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction, *Dev Biol.* 71(1):33-48pp.
- Shah, B., Kozlowski, R. L., Han, J. and Borchers, C. H.**, 2011, Emerging mass spectrometry-based technologies for analyses of chromatin changes: analysis of histones and histone modifications,259-303, *Methods Mol Biol.*, 773, Kermod A. L., (Eds), Humana Press, 423pp.
- Shen, X. and Perreault, H.**, 1999, Electrospray Ionization Mass Spectrometry of 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone Derivatives of Neutral and N-Acetylated Oligosaccharides, *J. Mass Spectrom.*, 34, 502-510pp.
- Shimizu, T., Kinoh, H., Yamaguchi, M. and Suzuki, N.**, 1990, Purification and Characterization of the Egg Jelly Macromolecules, Sialoglycoprotein and Fucose Sulfate Glycoconjugate, of the Sea Urchin *Hemicentrotus Pulcherrimus*, *Develop. Growth & Differ.*, 32 (5): 473-487pp.
- Shriver, Z., Sasisekharan, S. R. and Sasisekharan, R.**, Glycomics: A pathway to a class of new and improved therapeutics, *Nature Reviews*, Vol.3, Oct., 863-873pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sorensen, L. K.**, 2010, Determination of sialic acids in infant formula by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 24, 1208pp.
- Solis, D., Jimenez-Barbero J., Kaltner, H., Romero, A., Siebert, H. C., von der Lieth, C. W. and Gabius, H. J.**, 2001 Towards defining the role of glycans as hardware in information storage and transfer: basic principles, experimental approaches and recent progress. *Cells Tissues Organs*. 168(1-2):5-23pp.
- Steen, V. P., Rudd, M. P., Dwek, R. A. and Opdenakker, G.**, 1998, Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 33(3): 151-208pp.
- Strecker, G., Wieruszkeski, J. M., Plancke, Y. and Boilly, B.**, 1995, Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released from the jelly coats of the anuran *Xenopus laevis* by reductive p-elimination, *Glycobiology*, vol.5 no.1 137-146pp.
- Suphamungmee, W., Chansela, P., Weerachatanukul, W., Poomtong, T., Vanichviriyakit, R. and Sobhon, P.**, 2010, Ultrastructure, Composition, and Possible Roles of the Egg Coats in *Haliotis asinina*, *Journal of Shellfish Research*, 29(3):687-697pp.
- Taylor, M.E. and Drickamer, K.**, 2006, Introduction to Glycobiology, Oxford University Press Inc., New York, 255pp.
- Tseng, K., Lindsay, L. L., Penn, S., Hedrick, J. L. and Lebrilla, C. B.**, 1997, Characterization of Neutral Oligosaccharide-Alditols from *Xenopus laevis* Egg Jelly Coats by Matrix-Assisted Laser Desorption Fourier Transform Mass Spectrometry *Analytical Biochemistry* 250, 18–28pp.
- Tseng, K., Xie, Y., Seeley, J., Hedrick, J. L. and Lebrilla, C. B.**, 2001, Profiling with structural elucidation of the neutral and anionic O-linked oligosaccharides in the egg jelly coat of *Xenopus laevis* by Fourier transform mass spectrometry, *Glycoconjugate Journal*, 18, 309–320pp.
- Tsuboi, S. and Fukuda, M.**, 2001, Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses, *BioEssays*, 23:46-53pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Valianpour, F., Abeling, N. G. G. M., Duran, M., Huijmans, J. G. M. and Kulik, W.**, 2004, Quantification of Free Sialic Acid in Urine by HPLC–Electrospray Tandem Mass Spectrometry: A Tool for the Diagnosis of Sialic Acid Storage Disease. *Clinical Chemistry* , 50, 403pp.
- Varki, A.**, 1992, Diversity in the sialic acids. *Glycobiology.*, 2, 25pp.
- Varki, A.**, 1993, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology*, vol.3 no.2, 97-130pp.
- Varki, A.**, 1997, Sialic acids as ligands in recognition phenomena, *FASEB J.*, 248-255pp.
- Varki, A. and Diaz S.**, 1984, The Release and Purification of Sialic Acids from Glycoconjugates: Methods to Minimize the Loss and Migration of O-Acetyl Groups. *Analytical Biochemistry.*, 137, 236pp.
- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R. and Hart, G. W.**, Essentials of Glycobiology. 2nd ed.; ME, E., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2009.
- Varki A. and Lowe, J. B.**, 2009 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1897/#ch6.s7>--- (Erişim tarihi 21.06.2014)
- Varki, A.**, 2009, Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj. J.* 26, 231–245pp.
- Vasseur, E.**, Chemical Studies on the Jelly Coat of the Sea-Urchin Egg, 1948, *Acta Chemica Scandinavica*, 2: 900-913pp.
- Vilela-Silva, A.-C. E.S., Hirohashi, N. and Mourão, P. A. S.**, 2008, The structure of sulfated polysaccharides ensures a carbohydrate-based mechanism for species recognition during sea urchin fertilization, *Int. J. Dev. Biol.* 52: 551-559pp.
- Vilela-Silva, E.S. A. C., Alves, A. P., Valente, A. P., Vacquier, V. D. and Mourao, P. A. S.**, 1999, Structure of the sulfated α -L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition, *Glycobiology*, 9(9):927–933pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vo, L. H., Yen, T-Y., Macher, B. A. and Hedrick, J. L.,** 2003, Identification of the ZPC Oligosaccharide Ligand Involved in Sperm Binding and the Glycan Structures of *Xenopus laevis* Vitelline Envelope Glycoproteins, *Biology of Reproduction*, 69, 1822–1830pp.
- Wang, B. and Boons, G.-J.,** 2011, Carbohydrate Recognition Biological Problems, Methods, and Applications, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
- Wang, C., Fan, W., Zhang, P., Wang, Z. and Huang, L.,** 2011, One-pot nonreductive O-glycan release and labeling with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone followed by ESI-MS analysis, *Proteomics*, 11, 4229–4242pp.
- Wuhrer, M.,** 2013, Glycomics using mass spectrometry, *Glycoconj J*, 30:11-22p.
- Warren, L.,** 1959, The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *Journal of Biological Chemistry.*, 234, 1971pp.
- Yamaguchi, M., Kurita, M. and Suzuki, N.,** 1989, Induction of the Acrosome Reaction of *Hemicentrotus pulcherrimus* Spermatozoa by the Egg Jelly Molecules, Fucose-Rich Glycoconjugate and Sperm-Activating Peptide I, *Develop. Growth & Differ.*, 31 (3), 233-239pp.
- Yamakawa, N., Sato, C., Miyata, S., Maehashi, E., Toriyama, M., Sato, N., Furuhashi, K. and Kitajima, K.,** 2007, Development of sensitive chemical and immunochemical methods for detecting sulfated sialic acids and their application to glycoconjugates from sea urchin sperm and eggs, *Biochimie*, 89, 1396-1408pp.
- Yang, Y., Lee, K., Jang, K. S., Kim, Y. G., Park, S. H., Lee, C. S. and Kim, B. G.,** 2009, Low mass cutoff evasion with qz value optimization in ion trap. *Analytical Biochemistry* , 387, 133pp.
- Yeşilyurt, B., Şahar, U. and Deveci R.,** 2014, Determination of the type and quantity of sialic acid in the egg jelly coat of the sea urchin *Paracentrotus lividus* using capillary LC-ESI-MS/MS, *Molecular Reproduction and Development*, 19 DEC 2014, DOI: 10.1002/mrd.22448

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- York, W. S., Agravat, S., Kinoshita, K F., McBride, R., Campbell, M. P., Costello, C. E., Dell, A., Feizi, T., Haslam, S. H., Karlsson, N., Khoo, K. H., Kolarich, D., Liu, Y., Novotny, M., Packer, N., H., Paulson, J. C., Rapp, E., Ranzinger, R., Rudd, P. M., Smith, D. F., Struwe, W. B., Tiemeyer, M., Wells, L., Zaia, J. and Kettner, C., 2014, MIRAGE: The minimum information required for a glycomics experiment, *Glycobiology* vol.24 no.5, 402–406p.**
- Yu, G., Zhang, Y., Zhang, Z., Song, L., Wang, P. and Chai, W., 2010, Effect and limitation of excess ammonium on the release of O-glycans in reducing forms from glycoproteins under mild alkaline conditions for glycomic and functional analysis. *Anal Chem.*, 82(22):9534-42p.**
- Zaia, J., 2004, Mass Spectrometry of Oligosaccharides, *Mass Spectrometry Reviews*, 23, 161– 227p.**
- 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(8), 663p.**
- Zauner, G., Kozak, R. P., Gardner, R. A., Fernandes, D. L., Deelder, A. M. and Wuhrer, M., 2012, Protein O-glycosylation analysis, *Biol. Chem.*, Vol. 393, 687–708p.**
- Zenobi, R. and Knochenmuss, R., 1998, Ion formation in MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 17, 337–366p.**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad: Umut ŞAHAR

Doğum tarihi : 01.03.1980 Doğum yeri : VAN Cinsiyet : Erkek

ÖĞRENİM

- Lise : Atatürk Lisesi - VAN (1994-1998)
- Üniversite Lisans : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (1998-2003)
- Yüksek Lisans : Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Bilim Dalı (2004-2007)
- Doktora : Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2009-....)

AKADEMİK DURUM

- Uzman, (Başlangıç: Eylül 2010), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji AD.

Yayınlar

İndekslerce Taranan Dergilerdeki Yayınlar (3 adet)

1. 2015, Batuhan Yeşilyurt, Umut Şahar and Remziye Deveci. Determination of the type and quantity of sialic acid in the egg jelly coat of the sea urchin *Paracentrotus lividus* using capillary LC-ESI-MS/MS, Molecular Reproduction and Development, Volume 82, Issue 2, pages 115–122, February 2015
2. 2014, Savaş İzzetoğlu, Umut Şahar, Ecem Şener, Remziye Deveci, Determination of sialic acids in immune system cells (coelomocytes) of sea urchin, *Paracentrotus lividus*, using capillary LC-ESI-MS/MS. Fish & Shellfish Immunology, Volume 36, Issue 1, January 2014, P 181–186

3. 2015, Afrashi Filiz, Karatepe Hashas Arzu Seyhan, Shahbazov Cahit, Arici Mesut, Yikilmaz Mehmet Salih, Deveci Remziye, Karacali Sabire, and Sahar Umut. Reliability of Intravitreal Nepafenac in Rabbits. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. February 2015, 31(1): 43-50.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

1. U. SAHAR, I. GOKCEL, H. ERTAS, S.A. AKGUR “Determination of four nitrofuranes group antibiotics metabolites in honey by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry” *Ann Toxicol Anal.* 2008; 20(Suppl. 1): S1-S90 Schoelcher, Martinique, French West Indies, June 2-8, 2008
2. Sabire Karaçalı, Remziye Deveci, Savaş İzzetoğlu, M.Salih Yıkılmaz, Umut Şahar, Önder Deveci “Linkages, Modifications And Concentrations Of Sialic Acid In Ageing Process” *International Cell Death Society Symposium* May 28th-31st,2010, Kemer, Antalya, Turkey
3. Sabire Karaçalı, Remziye Deveci, Savaş İzzetoğlu, M.Salih Yıkılmaz, Umut Şahar, Önder Deveci, Seçkin Soya “ Determination of Sialic Acid in Prothoracic Glands and Hemolymph of *Galleria mellonella* During Aging Process” *SialoGlyco* August 21-26, 2010, Potsdam, Germany
4. Umut Sahar, Hasan Ertas, Savas Izzetoglu, Remziye Deveci, Sabire Karacali, “Analysis of Sialic acids with Capillary LC-ESI-MS/MS using sodiated adduct to eliminate low mass cut-off problem and water eliminated only fragmentation reactions in ion trap mass spectrometer”. *The International Congress on Bioinformatics and Biomics*, P35, 18-22 May 2011 Kusadasi, Turkey.
5. H. Coşkun, S. İzzetoğlu, U. Şahar, R. Deveci, S. Karaçalı. “Determination of Sialic Acid Types in Stem Cells and Differentiated Cells of *Paracentrotus lividus* By Fluorescence Microscopy and CapLC-ESI-MS/MS System” *1st Annual Congress On Stem Cell Research (with international participation)*, Sapanca, Turkey, 28 September-02 October 2011.

6. S. Karaçalı, R. Deveci, S. İzzetoğlu, M. S. Yıkılmaz, U. Şahar, Ö. Deveci, Microscopic And Analytic Determination Of Sialic Acid Modifications During Aeging Process In Prothoracic Glands Of Galleria Mellonella (L.). Kırgızistan 1. Uluslararası Biyoloji Kongresi, Bişkek-Kırgızistan, 24-27 Eylül 2012
7. Şahar U., Döşkaya M., Caner A., Can H., Atalay E., Değirmenci Döşkaya A., Deveci R., Gürüz Y. (2014). Preliminary analysis of monosaccharides in virulent T. gondii Ankara and Ege-1 strains by Cap LC-ESI-MS/MS. Poster, 22nd ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Barselona, İspanya, 10-14 Mayıs 2014. Abstract book p.169

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

1. Şahar U., Ertaş H., Gökçel H. İ., “Balda Nitrofuran Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Tayini” VI. Ulusal Kromatografi Kongresi, İzmir, 2006
2. Sabire Karaçalı, Remziye Deveci, Savaş İzzetoğlu, M.Salih Yıkılmaz, Umut Şahar, Önder Deveci, “Determination Of Sialic Acid and 9-O-Acetyl GD3 During Ageing Process” 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, S: 1030-1031, 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye
3. Cemal Ün, Savaş İzzetoğlu, Remziye Deveci, Umut Şahar, Turgay Taşkın, Yalçın Yaman, Sabire Karaçalı, “Süt ve Kırmızı Ette Kanser ile İlişkili Neu5Gc Sialik Asidinin Azaltılması Amacıyla Moleküler Genetik ve Hayvan Islahının Uygulanması”, P-024, Türkiye İhracatçılar Meclisi Gıda Ar-Ge Proje Pazarı, 29 Mayıs 2012, İzmir
4. Ebru Tekin, Mustafa Ateş, Umut Şahar, “Determination of ectoine production of halotolerant bacterial isolate ma2” Ulusal Biyoloji Kongresi, S: 387-388, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye
5. Umut Şahar, Didem Erkan, Remziye Deveci, “Çesitli liken türlerinde analitik (capLC-ESI-MS/MS) yöntemlerle sialik asit (Neu5Ac) belirlenmesi”, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, S: 391-392, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye

6. Ecem Şener, Merve Açıklık, Umut Şahar, Remziye Deveci, “Lektin blotting ve capLC-ESI-MS/MS sistemi ile gelişen Balb/c fare omuriliğinde sialik asitlerin ve tiplerinin belirlenmesi”, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, S: 396-397, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye
7. Seçkin Soya, Umut Şahar, Sabire Karaçalı, “Neu5Ac (sialik asit)’nin ipekböceği (*Bombyx mori* L.) ip merdiven sinir sisteminde yaşlanmaya bağlı miktar değişikliklerinin LC-MS/MS ile belirlenmesi” 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, S: 409, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye
8. Atabak Naghavi, Umut Şahar, Soycan Mızrak, Remziye Deveci, Gülinnaz Ercan, Sabire Karaçalı, “Düşük-yüksek doz nikotin kullanımının floresan immunohistokimya ve LC-MS/MS yöntemleriyle sıçanların hipokampus ve serum sialik asitlerine etkisinin belirlenmesi”, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, S: 412, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye
9. Umut Şahar, Remziye Deveci, “N-Glikan Yapılarının MALDI-TOF MS ve LC-ESI-Ion Trap MS sistemleri İle Analizi ve Glycowork Bench Programı İle Data Değerlendirilmesi”, 2. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, SB12: sayfa 30, 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye
10. Atabak Naghavi, Umut Sahar, Remziye Deveci, Sabire Karaçalı, M. Salih Yıkılmaz, “Yaşlanan Model Organizma *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da Gangliosit GD3 Belirlenmesi”, 2. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, SB10: sayfa 27, 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye
11. Hakan Coşkun, Savaş İzzetoğlu, Umut Şahar, Merve Açıklık, Remziye Deveci, Sabire Karaçalı, Denizkestanesi (*Paracentrotus lividus*)’nin Embriyonik Gelişim Sürecinde Sialik Asit Çeşitlerinin Floresan Mikroskop ve Cap-LC-ESI-MS/MS Sistemi ile Belirlenmesi, 2. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, SB07: sayfa 24, 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye
12. Hüseyin Özaydın, Savaş İzzetoğlu, Umut Şahar, Remziye Deveci, Denizkestanesi *Paracentrotus lividus*'ta Farklılaşmamış ve Farklılaşmış Kan Hücrelerinin Sialik Asit İçeriklerinin Karşılaştırılması, 2. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, SB13: sayfa 31, 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye

13. Ecem Şener, Savaş İzzetoğlu, Umut Şahar, Remziye Deveci, Denizkestanesi (*Paracentrotus lividus*) İmmün Sistem Hücrelerinde CapLC-ESI/MS-MS ve Floresan Mikroskobu ile Monosakkarit Belirlemeleri, 2. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, SB14: sayfa 32, 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye
14. Batuhan Yeşilyurt, Remziye Deveci, Umut Şahar, Sabire Karaçalı, Denizkestanesi (*Paracentrotus lividus*) Gamet Yüzeylerindeki Sialik Asitlerin Döllenmedeki Rolünün Araştırılması, 2. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, SB15: sayfa 33, 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye
15. Umut Şahar, Aslı Şahiner, Ece Halat, Pınar Alkan, Mustafa Ateş, Güven Özdemir, “Sodyum Hipoklorit Çözeltilerinde Aktif Klor Derişimini Etkileyen Faktörler ve Biyosidal Analizlerindeki Önemi”, Ulusal Biyosidal Kongresi, SS, 19-22 Mart 2014, Antalya, Türkiye
16. Seçkin Soya, Umut Şahar, Mehmet Salih Yıkılmaz, Sabire Karaçalı, İpekböceği (*Bombyx mori* L.) Sinir Sisteminde Yaşlanma ve Gelişim Sürecinde Şeker Değişikliklerinin ve Glikan Profillerinin Belirlenmesi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, HB-S4-8, S:269, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye
17. Savaş İzzetoğlu, Remziye Deveci, Umut Şahar, Ecem Şener, Denizkestanesi, *Paracentrotus lividus*'un Kan Hücrelerinde Sialik Asit Tip, Miktar, Dağılım ve Bağ Özelliklerinin Analitik ve Mikroskobik Yöntemlerle Belirlenmesi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, BİY-P1-2, S:652, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye

Projeler

1. Denizkestanesi, *Paracentrotus lividus*'un kan hücre tiplerinin (coelomositler) morfolojisi ile kan hücrelerinde sialik asit tip, miktar, dağılım ve bağ özelliklerinin analitik (CapLC-ESI/MS-MS) ve mikroskobik (Transmisyon Elektron ve Floresans mikroskop) yöntemlerle belirlenmesi TÜBİTAK Projesi, 112T646, (Uzman Araştırmacı), 2012
2. Pre-Postnatal Nikotin Kullanımının Sıçan Beyin Dokularındaki Sialik Asitlere Etkisi, E.Ü. Araştırma Fonu Projesi, 2010 TIP 068, (Araştırmacı), 2012.

3. Non Steroid Anti Enflamatuar Moleküllerin İntra Vitreal Uygulanması, E.Ü. Araştırma Fonu Projesi, 2010 TIP 024 (Araştırmacı) 2010-2011.
4. Doğal Genç-Yaşlı ve Deneysel Yaşlandırılmış-Gençleştirilmiş Böcek Model Sistemde Hücre ve Organizma Düzeyinde Yaşlanmanın Moleküler Mekanizması, DPT Projesi, 06-DPT-003 (Araştırmacı) 2010.
5. Embriyoda Cinsiyetin Belirlendiği Süreçte Antimüller Hormonda Sialik Asit Değişiklikleri ile Müller Kanalında Apoptozis İlişkisinin Araştırılması, TÜBİTAK Projesi, 107T129 (Bursiyer), 2010.
6. Doğal Genç-Yaşlı ve Deneysel Yaşlandırılmış-Gençleştirilmiş Böcek Model Sistemde Hücre ve Organizma Düzeyinde Yaşlanmanın Moleküler Mekanizması, EBİLTEM Projesi, 07 BİL 014 (Araştırmacı), 2010.
7. Bombyx mori (Lepidoptera)'nın Dorsal Damar ile İlişkili Yeni Hematopoitik Organından Salınan Farklılaşmamış Hemositler ile Dolaşımdaki Farklılaşmış Hemositlerin in vitro Koşullarda Sialik Asit İçeriklerinin Optik ve Analitik Yöntemlerle Karşılaştırılması TÜBİTAK Projesi, 109T528, (Uzman Araştırmacı), 2010
8. Denizkestanesi sperm-yumurta interaksiyonunda yüzey sialik asitlerinin öneminin deneysel olarak araştırılması, TÜBİTAK Projesi, 2012. 2209, Üniversite Öğrencileri Yurt İçi / Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı
9. LC-ESI-MS/MS sistemi ve lektin blotting ile gelişen BALB/C fare omuriliğinde sialik asitlerin ve tiplerinin belirlenmesi, TÜBİTAK Projesi, 2012. 2209, Üniversite Öğrencileri Yurt İçi / Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı
10. *Paracentrotus lividus*'un Farklılaşan Kök Hücrelerinde Sialik Asit Çeşitlerinin Floresan Mikroskop ve LC-ESI-MS/MS Sistemi ile Belirlenmesi, TÜBİTAK Projesi, 2012. 2209, Üniversite Öğrencileri Yurt İçi / Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı

Görev alınan kongre organizasyonları:

1. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye
2. 2. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, 11-14 Haziran 2013, İzmir, Türkiye

Patent Başvuruları:

1. Kanser Hücresi Tanısında anti-KDN antikoru kullanılması
2. Kurutulmuş sebze ve meyvelerde hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanımının saptanması