



**İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM TANISI ALMIŞ
MEME DOKUSU ÖRNEKLERİNE AİT N-BAĞLI
GLİKOZİLASYON YAPILARININ GLİKOMİKS
YAKLAŞIMI İLE ANALİZİ VE BİYOBELİRTEÇ
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Emrah YAMAN
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Doktora Tezi - 2018

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM TANISI ALMIŞ MEME DOKUSU
ÖRNEKLERİNE AİT N-BAĞLI GLİKOZİLASYON YAPILARININ
GLİKOMİKS YAKLAŞIMI İLE ANALİZİ VE BİYOBELİRTEÇ
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Emrah YAMAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
II. Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bekir SALİH

ERZURUM
2018

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM TANISI ALMIŞ MEME DOKUSU
ÖRNEKLERİNE AİT N-BAĞLI GLİKOZİLASYON YAPILARININ
GLİKOMİKS YAKLAŞIMI İLE ANALİZİ VE BİYOBELİRTEÇ
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Emrah YAMAN

Tez Savunma Tarihi : 26.03.2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Tez İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Bekir SALİH (Hacettepe Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Elif ÇADIRCI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Beyzagül POLAT (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Alptuğ ATİLA (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Ü. Muhammed Fatih POLAT (Erzincan Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM- 2018

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Genomik Veriler Işığında Proteomiks ve Glikoproteomiks	5
2.1.1. İnsan Genom Projesi ve Sonuçları	5
2.1.2. Protein Yapısının Önemi ve Proteomiks Kavramı	6
2.1.3. Proteinlerde Post Translasyonel Modifikasyonlar	8
2.1.4. Protein Glikozilasyonu	9
2.1.5. Glikoproteomiks ve Glikomiks.....	12
2.2. N-Glikanlar	12
2.2.1. N-Glikanların Yapısı.....	12
2.2.2. N-Glikanların Biyosentezi	13
2.3. Meme Kanserinde Spesifik biyobelirteçler olarak N-Glikanlar	16
2.3.1. Meme Kanseri.....	16

2.3.2. İnvaziv Duktal Karsinom.....	17
2.3.3. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler	17
2.3.4. Meme Kanserinde Derecelendirme	18
2.3.6. Biyobelirteç Kavramı.....	20
2.3.7.Kanser Biyobelirteçleri Olarak Glikoproteinler	21
2.3.8. Kanserli Hücrelerde Glikozilasyon.....	22
2.4. Kanserde Formalinli Arşiv (FFPE) Doku Örnekleri.....	23
2.4. FFPE Dokularda N-Glikan Analizleri	24
2.4.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	24
2.4.2. N-Glikanların Glikoproteinlerden Ayrılması (Deglikozilasyon).....	25
2.4.3. N-Glikanların Etiketlenmesi	28
2.4.4. N-glikanların Saflaştırılması ve Zenginleştirilmesi	30
2.4.5. N-glikanların için Enstrümental Ayırma Yöntemleri	31
2.4.6. N-glikanlar için Dedeksiyon Yöntemleri.....	33
2.4.7. Meme Kanseri ve Diğer Vaka-Kontrol Örneklerinde N-Glikanların Biyobelirteç Potansiyeli Üzerine Yapılmış Araştırmalar	37
2.5. Biyobelirteç Keşif Çalışmalarında Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	48
3. MATERYAL VE METOT.....	54
3.1. Kullanılan Materyaller	54
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	54
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	54

3.2. FFPE Dokulardan N-Glikanların İzolasyonu	55
3.2.1. FFPE Dokulardan Parafinin Uzaklaştırılması ve Rehidrasyon.....	55
3.2.2. Doku Numunelerinin Denaturasyonu ve Deglikozilasyonu	55
3.2.3. N-Glikanların 2AA İle Etiketlenmesi	56
3.2.4. N-Glikanların Etil Esterifikasyon İle Etiketlenmesi.....	56
3.2.5. N-Glikanların Zenginleştirilmesi	57
3.3. N-Glikanların MALDI-TOF-MS Analizleri.....	57
3.3.1. MALDI-TOF-MS Yöntemi için Numune Hazırlama İşlemi.....	57
3.3.2. MALDI-TOF-MS Yöntemi için Spektroskopik Koşullar	58
3.3.3. MALDI-TOF-MS Yöntemi Sonuçlarının Sayısal Verilere Dönüştürülmesi.....	58
3.4. N-Glikanların HPLC-FD Analizleri	58
3.4.1. HPLC-FD Yöntemi için Kromatografik Koşullar	58
3.4.2. HPLC-FD Yöntemi Veri Analizi.....	59
3.5. Çalışmada kullanılan Doku Örneklerine Ait Bilgiler	60
3.6. İstatistiksel Veri Analizleri	60
4. BULGULAR.....	62
4.1. MALDI-TOF-MS Analizlerinde Zenginleştirme Çalışmalarının Karakterizasyonu	62
4.2. N-bağlı Glikan Yapıların Etiketleme Verimliliği	64
4.3. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği	64

4.4. MALDI-TOF-MS Spektrumlarından N-Bağlı Glikanlar ve Glikan Gruplarının Belirlenmesi	66
4.5. MALDI-TOF-MS Sonuçlarının İstatistiksel Analizleri.....	69
4.5.1. İstatistiksel Olarak Anlamli Farklılıkların Belirlenmesi.....	69
4.5.2. N-glikanların Değişiminde Korelasyon (Bağıntı) İlişkisi.....	73
4.5.3. N-glikozilasyon Gruplarının Yanıt Tahmin Yetenekleri (ROC Analizi)	75
4.5.5. Çoklu N-glikan Değerlerinin Temel Bileşen Analizleri (PCA).....	77
4.4.5. Lasso Regresyon Analizi	79
4.4.6. Kümeleme Analizleri	82
4.5. HPLC-HILIC-FD Yöntemi ile N-Glikanların Analizi.....	84
5. TARTIŞMA.....	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR	109
EKLER	128
EK 1. ÇİZELGELER	128
EK 1-A: Meme kanseri doku örneklerinde tespit edilen N-glikanlara ait özellikleri ..	128
EK 1-B: N-Glikan ve N-glikozilasyon grupları değerleri ile kanserli-kontrol grupları arasındaki t-testi sonuçları	130
EK 1-C: Her bir numuneye ait N-Glikan grup miktarları ile kanserli-kontrol grupları ve nükleer grade seviyeleri arasındaki Kruskal-Wallis testi sonuçları.....	132
EK 1-D: Spearman korelasyon yöntemi ile 16 N-glikan değişkeni arasında elde edilen regresyon katsayısı (r) değerleri	133

EK 1-E: N-glikan grupları ve grupların bağıl bolluk değerlerinin hesaplanması..... 134

EK 2. ÖZGEÇMİŞ..... 139

EK 3. ETİK KURUL ONAY FORMU 140



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım ilk günden beri bana inanan, mesleki anlamda ihtiyaç duyduğum deneyimi elde etmem için değerli bilgi ve birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, akademik hayatımın her aşamasında yoğun çalışma temposuna rağmen fikirleri, ilgisi ve yardımlarıyla bana destek olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na,

bu ortak çalışmanın planlanması ve hayata geçirilmesi aşamasında fikirleriyle beni yönlendiren, araştırma laboratuvarına kabul ederek tüm imkanları sunan ve kısıtlı zamanına rağmen değerli bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan tez ortak danışmanım Sayın Prof. Dr. Bekir SALİH'e,

çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında yardımlarıyla yanımda olan ve çalışmanın tüm aşamalarında çok büyük emeği bulunan değerli meslektaşım Dr. H. Mehmet KAYILI'ya,

doku örneklerinin temininde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Mevlüt ALBAYRAK ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığına,

tez çalışmalarım sırasında diğer görevlerimde bana yardım ederek yükümü hafifleten Anabilim Dalımız yüksek lisans öğrencisi Kim. Müh. Nurgül KIZILTAŞ'a ve grafik tasarımlarında bana yardımcı olan Ecz. Oğuzhan SAVAŞ'a,

Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerine ve çalışmalarım sırasında bana yardımlarıyla destek olan Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Proteomiks Araştırma Laboratuvarındaki SALİH Araştırma Grubu araştırmacılarına,

ve hayatımın her aşamasında sevgileriyle yolumu aydınlatan aileme, en derin şükranlarımı sunarım.

Mehmet Emrah YAMAN

ÖZET

İnvaziv Duktal Karsinom Tanısı Almış Meme Dokusu Örneklerine Ait N-Bağlı Glikozilasyon Yapılarının Glikomiks Yaklaşımı ile Analizi ve Biyobelirteç Potansiyellerinin Araştırılması

Amaç: İnvaziv duktal karsinom tüm dünyada en çok görülen ve en yüksek yayılma hızına sahip olan meme kanseri türüdür. İDK'nın erken dönemlerinde teşhisi ile zararlı etkilerinin azaltılması ve iyileştirilebilmesi için belli bir kanseri diğer hastalıklardan ayırt edebilen biyolojik belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada İDK tanısı almış hastalara ait doku örnekleri ve kontrollerdeki proteinlerin MALDI-TOF-MS ve HPLC-FD yöntemleri ile N-glikozilasyon profillerinin ve bunların biyobelirteç potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: Formalinle sabitlenmiş parafine gömülü doku örnekleri ksilen ile deparafinize edildi. Etanol ile rehidrasyona maruz bırakılan örnekler DDT içeren tampon çözelti ile denature edildi. Numuneler PNGase-F enzimi ile N-glikan yapılarının peptidlerden koparılarak serbest hale geçmesi sağlandı. Etiketleme, saflaştırma ve zenginleştirme işlemlerinin ardından etiketli N-glikanlar MALDI-TOF-MS cihazı ile negatif, lineer modda analiz edildiler. Aynı numuneler HPLC-FD sisteminde 330 – 420 nm dalga boylarında gradient elüsyonla analiz edildiler. Sonuçlar istatistiksel çözümlenmelerle yorumlandı.

Bulgular: MALDI-TOF-MS analizleri sonucu kanserli ve kontrol grupları arasında farklılık gösteren yapıları ortaya koymak amacıyla yapılan t-testi analizlerinde 16 N-glikan ve 5 N-glikan grubunda $p < 0,001$ seviyesinde anlamlı farklılık gözlemlendi. Bunlar arasından 5 N-glikan yapısının (H4N4F1, H5N5F1, H6N5F1S2, H9N2 ve H5N5F1S1) kanserli-kontrol örneklerini tam olarak birbirinden ayırabilecek güçte bir farklılık gösterdiği tespit edildi. HPLC-FD analizleri ile 24 adet N-glikan yapısı belirlendi. Ayrıca ROC analizi sonuçları tek antenli N-glikanların, numuneler üzerinde yüksek bir tanı yeteneği gösterdiğini ortaya koymuştur.

Sonuç: 6 N-glikan yapısının bir arada değerlendirildiği modelin ve tek antenli N-glikan grubu değerinin biyobelirteç potansiyeline sahip olduğu önerilmektedir. Ayrıca çalışma sonuçlarının meme kanserli örneklerde bundan sonra yapılacak glikomiks araştırmaları için bir kilometre taşı niteliğinde olduğu kanatındeyiz.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteçler, glikomiks, HPLC-FD, invaziv duktal karsinom, MALDI-TOF-MS

ABSTRACT

Analysis of N-Linked Glycosylation Patterns from Invasive Ductal Carcinoma Recognized Breast Tissue Specimens by Glycomics Approach and Investigation of Their Biomarker Potentials

Aim: Invasive ductal carcinoma is the most common breast cancer type and has the highest invasion rate of them in the world. There is a need for biomarkers that can distinguish a particular cancer from other diseases and improve the diagnosis of IDC in the early stages in order to reduce the harmful effects. In this study, MALDI-TOF-MS and HPLC-FD analysis were performed to determine the N-glycosylation profiles and their biomarker potentials of proteins in diseased tissue specimens and controls in IDC.

Material and Method: Formalin fixed and paraffin embedded tissue specimens were deparaffinized by xylene. The samples were subjected with ethanol to rehydration, then denatured with a denaturation buffer containing DTT. The samples were incubated with PNGase-F to allow N-glycan structures to be released from the peptides. After labelling, purification and enrichment procedures, N-glycans were analyzed with a MALDI-TOF-MS instrument in linear negative ionization mode. The same samples were analyzed by gradient elution at 330-420 nm wavelengths in the HPLC-FD system. The results were interpreted via statistical analysis.

Results: Statistical analysis performed to reveal the structure which differs between cancer and control samples according to the results of MALDI-TOF-MS analyzes, a significant difference was observed at the level of $p < 0.001$ in 10 N-glycan structures and 5 N-glycan groups. It was observed that three of the N-glycan structures (H5N5F1, H5N5F1S2, H4N4F1, H5N5S2, H6N5F1S2, H9N2) were formed a model that successfully separated the cancer-control cases. Also 24 N-glycan structures were detected by HPLC-FD analysis. Moreover, ROC analysis results have showed that the single-antennary N-glycans provide a high diagnostic ability on the samples.

Conclusion: It is suggested that the model in which the 5 N-glycan species are evaluated together and single-antennary N-glycans group values have biomarker potency. We are also witnessing that the results of the study are a milestone for future glycomics studies in breast cancer samples.

Key Words: Biomarkers, glycomics, HPLC-FD, Invasive ductal carcinoma, MALDI-TOF-MS

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2-AA	: 2-Aminobenzoik asit
2-AB	: 2-Aminobenzamid
2-AP	: 2-Aminopiridin
2DE	: 2 boyutlu elektroforez
ACN	: Asetonitril
ANTS	: 2-aminonaftalen trisülfonik asit
APTS	: 1-aminopiren-3,6,8-trisülfonik asit
ASN	: Asparajin
CEA	: Karsino embriyonik antijen
DCIS	: Duktal karsinom in situ
DHB	: 2,5-dihidrobenzoik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDC	: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimit hidroklorür
ER	: Endoplazmik retikulum
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
FD	: Floresans dedektör
FFPE	: Formalinle sabitlenmiş parafine gömülü doku
Fuc	: Fukoz
Gal	: Galaktoz
GalNAc	: n-asetil galaktozamin
GlcNAc	: n-asetil glikozamin
GnT-V	: N-asetilglukozaminiltransferaz-V
HIAR	: Isı destekli antijen gerikazanım tekniği

HILIC	: Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi
HOBt	: 1-Hidroksibenzotriazol
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
İDK	: İnvaziv duktal karsinom
İGP	: İnsan genom projesi
İHK	: İmmünohistokimya
LCIS	: Lobuler karsinom in situ
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi
MALDI	: Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu
Man	: Mannoza
mRNA	: mesajcı-Ribonükleik asit
NeuAc	: Sialik Asit (n-asetilneuraminik asit)
N-Glikan	: Azot atomu üzerinden proteine bağlı oligosakkaritler
NG	: Nükleer <i>grade</i>
NIH	: Amerikan Ulusal sağlık kurumu
PCA	: Temel bileşen analizi
PNGase F	: Peptid endo-β-N-asetilglukozaminodaz F Enzimi
PTM	: Post translasyonel modifikasyon
RNA	: Ribonükleik asit
S-DHB	: 2,5-dihidroksibenzoik asit (2,5-DHB) ve 2-hidroksi-5-metoksibenzoik asit karışımı
TFA	:Trifloro asetik asit
TFMS	:Triflorometan sülfonik asit
TMT	:Tandem kütle etiket reaktifi
TOF	:Uçuş süresi " <i>Time of flight</i> "

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. DNA translasyonu ile mRNA'ya aktarılan genetik bilgi ile hücrede gerçekleşen protein sentezi	7
Şekil 2.2. Tek bir genin üzerinden birden fazla gen ürününe oluşmasını sağlayan biyolojik mekanizmalar.	9
Şekil 2.3. Post-translasyonel modifikasyonlar sonucu protein fonksiyonunun değişimi.....	10
Şekil 2.4. N-glikan yapıları A) Yapısal gruplar B) Tüm N-glikanlara özgü çekirdek yapı.....	13
Şekil 2.5. N-glikanların glikoproteinlerden ayrılmasını sağlayan PNGase F enzimatik reaksiyonu	27
Şekil 2.6. Biyolojik numunelerde glikan analizi için genel prosedür.....	28
Şekil 2.7. N-glikanların 2-AA ile etiketlenme reaksiyonu	29
Şekil 2.8. MALDI iyonizasyon diagramı	36
Şekil 4.1. Farklı zenginleştirme materyalleri ile elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları	62
Şekil 4.2. Meme kanseri tanısı almış bir hasta numunesinin 2 farklı fraksiyonuna ait MALDI-TOF-MS spektrumları	63
Şekil 4.3. 2-Amino benzoik asit ile etiketlenen bir hasta doku örneğine ait MALDI-TOF-MS spektrumu	64
Şekil 4.4. N2 nolu kanser dokusuna ait dört farklı ölçüm sonucu elde edilen N-glikan değerlerin ortalamaları	65
Şekil 4.5. N2 nolu kanser dokusuna ait dört farklı ölçüm sonucu elde edilen N-glikozilasyon gruplarına ait değerlerin ortalamaları	65

Şekil 4.6. MALDI-TOF-MS yöntemiyle FFPE doku örneklerinden elde edilen ve N-glikan yapıları belirlenen bir kontrol ve bir hastaya ait kütle spektrumları.....	67
Şekil 4.7. Kanserli-kontrol grupları arasında $p<0.001$ seviyesinde anlamlı farklılık gösteren N-glikan türlerine ait kutu grafikler	72
Şekil 4.8. Kanserli-kontrol grupları arasında $p<0.001$ seviyesinde anlamlı farklılık gösteren N-glikan gruplarına ait kutu grafikler	72
Şekil 4.9. N-glikan ölçümlerinin kanser-kontrol gruplarındaki değişimlerini gösteren Spearman kolerasyon testi sonuçlarına ait ısı grafiği	74
Şekil 4.10. N-glikan ölçümlerinin kanser-kontrol gruplarındaki değişimlerini gösteren Spearman Kolerasyon grafiği.....	74
Şekil 4.11. N-glikozilasyon gruplarına ait ROC analiz eğrileri nolu grup.....	76
Şekil 4.12. 16 N-glikan değeri için gerçekleştirilen temel bileşen analizi sonuçlarının grafiksel gösterimi	79
Şekil 4.13. Lasso analizi sonucu sıfırdan farklı λ değerlerine sahip olan N-glikan yapılarına ait katsayı değişim grafiği.....	80
Şekil 4.14. Lasso değişken seçimi yöntemi ile belirlenen modellere ait binomial sapma değerleri	81
Şekil 4.15. Kanser-kontrol gruplarını tanımlamak için G9 (H7N2), G23 (H9N2), G27(H5N5F1), G35 (H5N5S2) ve G37 (H5N5F1S2) numaralı N-glikan ölçümleri ile oluşturulan kümeleme analizine ait dendrogram	82
Şekil 4.16. Hiyerarşik kümeleme analizi validasyon testine ait dendrogram.....	83
Şekil 4.17. Kanser-kontrol gruplarını tanımlamak için G9 (H7N2), G23 (H9N2), G27(H5N5F1), G35 (H5N5S2) ve G37 (H5N5F1S2)) numaralı N-glikan ölçümleri ile oluşturulan kümeleme analizine ait ısı-haritası grafiği.....	84

Şekil 4.16. HPLC-HILIC-FD ölçümleri ile gruplandırılan N-glikanların kromatogram üzerindeki konumları.....	87
Şekil 4.17. N-Glikanların HPLC-FD ölçümlerine ait fraksiyonların MALDI-TOF-MS spektrumları (GP1 – G10).....	88
Şekil 4.18. N-Glikanların HPLC-FD ölçümlerine ait fraksiyonların MALDI-TOF-MS spektrumları (GP11 – GP18).....	89



TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. N-glikanları oluşturan oligosakkaritlerin sembolleri ve kimyasal yapıları ..	14
Tablo 2.2. Meme kanserinde histolojik derecenin belirlenmesinde kullanılan yarı-kantitatif yöntemler.....	19
Tablo 2.3. N-glikanların etiketlenmesinde kullanılan floresans özellikli reaktifler.....	34
Tablo 2.4. Yeni bir tanı testi sonucunda oluşabilecek muhtemel durumlar.....	50
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan ve İDK tanısı almış 25 hastaya ait patoloji rapor bilgileri.....	61
Tablo 4.1. Benzer kimyasal özelliğe sahip N-glikanlardan oluşan gruplar	68
Tablo 4.2. Kanserli-kontrol grupları arasındat-testi sonucu anlamlı farklılık gösteren N-Glikanlar	70
Tablo 4.3. Kanserli-kontrol grupları arasında t-testi analizi sonucu anlamlı farklılık gösteren N-Glikan grupları	70
Tablo 4.4. Kanserli-kontrol grupları arasında Kruskal-Wallis testi sonucu anlamlı farklılık gösteren N-glikanlar ve N-glikan grupları	71
Tablo 4.5. N-glikozilasyon gruplarında ROC algoritmasının sınır değerler için kategoriler	75
Tablo 4.6. 16 N-glikana ait değerleri için yapılan temel bileşen analizi sonucu elde edilen eksen gruplarına ait etki değerleri.....	78
Tablo 4.7. Lasso algoritması ile geliştirilen tahmin modelindeki değişkenlere ait katsayı değerleri.....	81
Tablo 4.8. HPLC-FD analizlerin elde edilen kromatograma ait fraksiyonların MALDI-TOF-MS spektrumlarında tespit edilen N-glikanlar	86
Tablo 5.1. Meme kanseri biyobelirteçleri olarak önerilen N-glikan yapıları.....	100

Tablo 5.2. HILIC-FD yöntemi ile N-glikan analizi konusunda daha önce bildirilmiş
çalışmalarda uygulanan parametreler 103



1. GİRİŞ

Meme kanseri tüm dünyada kadınlar arasında en çok görülen ikinci ölüm nedeni olan multifaktoriyel bir hastalıktır ve kadınlarda kanserlerin %24' ünü oluşturur. Türkiye için de durum farklı değildir. 1993 yılında 24/100.000 olan meme kanseri insidansı 2010 yılı itibariyle 50/100.000'e çıkmıştır.¹ Kanserın erken dönemlerinde teşhisi ile zararlı etkilerinin azaltılması ve iyileştirilebilmesi için belli bir kanseri diğer hastalıklardan ayırt edebilen biyolojik belirteçleri belirleme çabaları birçok zorlukla karşı karşıyadır. Bu zorluklardan bazıları, potansiyel biyolojik belirteçlerin üretildiği biyolojik örneklerin karmaşıklığı, farklı hastalıklar arasındaki potansiyel analitlerin geniş heterojenitesi ve mevcut analitik yöntemlerin sınırlamalarıdır.²

Biyolojik Belirteçler (Biyobelirteçler) belli bir fizyolojik durumu kesin olarak tanımlayan biyolojik işaretlerdir. Bu işaret ölçülen bir veya birden fazla bileşenin sayısal veya görsel değeri olabilmektedir. Biyobelirteçler belirli bir hastalık durumunun taranması, tedavi altındaki hastaların izlenmesi, bir hastalık durumunun tekrar nüksetme ihtimalinin belirlenmesi ve hatta bir hastalığın oluşma riskinin yüksek olduğu kişi gruplarının belirlenmesi için kullanılabilir.² Biyolojik belirteçler için tarama yapılması, potansiyel indikatör analitlerin spesifik gereklilikleri karşılamaını sağlamak için kapsamlı bir araştırma gerektirir. Biyobelirteç için kanser belirtisinin ne zaman var olduğunu (hassasiyet) veya olmadığını (özgünlük) tanımlayabilmesi beklenir. Çoğu potansiyel kanser biyobelirteçleri bu testi geçemez; yanlış pozitif sonuçlara ve yanlış negatiflere neden olurlar.³

Biyobelirtecin hangi numuneler üzerinde aranacağı da oldukça önemli bir konudur. Numuneler, yanlış tanıya neden olabilecek hataları en aza indirmek için sağlam ve tekrarlanabilir enstrümantasyona uygun olmalıdır. Mümkünse numuneler, invaziv

olmayan bir tarzda kolayca elde edilebilir olmalıdır ve tahlil yöntemi her gelir grubundan bireyin ulaşabileceği düzeyde ekonomik olmalıdır. Ayrıca biyobelirteç için önerilen tahlil yönteminin geniş bir popülasyon yelpazesinde ve farklı taraflarca (farklı laboratuarlarda) valide edilmesi gerekir.³

Kanser biyobelirteçleri için yapılan çalışmalarda materyal olarak başta serum ve plazma örnekleri olmak üzere insan vücuduna ait farklı türde birçok biyolojik numune kullanılmıştır. Serum ve plazma örnekleri kolay elde edilebilir olmaları açısından avantajlıdır. Bir diğer avantajı içeriklerindeki protein, peptid, metabolit, serbest DNA-RNA kalıntıları gibi analitlerin kanser teşhisinin en önemli hedef molekülleri olmasıdır. Buna rağmen kandaki birkaç yoğun proteinin perdeleme etkisi hedef moleküle ulaşmayı zor hale getirir ve post-translasyonel modifikasyonların varlığı bu bileşenlerin karakterizasyonunu güçleştirir. Nitekim biyobelirteç olarak kullanılan biyomoleküllerin birçoğunun serum ve plazma örnekleri yerine diğer biyolojik örneklerde tespit edildikleri görülmektedir. Doku ve vücut sıvıları gibi örneklerin temini daha zor olsa da bu numunelerden elde edilebilecek ve hastalığı sağlıklı hücrelerden ayırabilecek yeni moleküler hedeflerin varlığı, terapötik fırsatları büyük ölçüde artırabilir.⁴⁻⁵

Kanser biyobelirteçlerinin keşfi amacıyla kullanılan deneysel yöntemler doğası gereği disiplinler arası ve çok merkezli çalışmaları gerektirir. Ancak bu çalışmalarda analitik kimyasal tekniklerin önemli bir yeri vardır. Bugüne kadar kullanılan biyobelirteç keşif çalışmalarında DNA, RNA ve microRNA gen dizi analizleri, protein mikroarray teknolojisi ve özellikle proteinler için 2D-Jel elektroforez yöntemi sıklıkla kullanılmıştır. Ancak son dönemde kütle spektroskopik tekniklerin bu alanda kullanımının hızlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Biyolojik moleküllerin tanımlanmasında son on yılda büyük teknolojik gelişmelerin gerçekleştiği kütle spektroskopisi teknikleri, sahip oldukları çok yönlülük ve hassasiyetle biyobelirteç keşif çalışmalarının vazgeçilmezi

haline gelmiştir. Bugün yüksek bir popülariteye sahip olan proteomiks, peptidomiks, metabolomiks, proteoglikomiks, glikomiks ve MS görüntüleme yöntemlerinin tamamı kütle spektroskopisi teknolojisinin bir eseridir.³

Protein biyosentezi sırasında bazı moleküller enzimatik yollarla amino asitlere kovalent olarak bağlanır. Post translasyonel modifikasyon (PTM) olarak adlandırılan bu mekanizma proteinlerin biyolojik rollerine ait çok değerli bilgiler verir. En yaygın PTM'ler glikozilasyon (N- ve O-bağlantılı), fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon ve sülfatasyondur. Yapılan araştırmalar PTM bakımından normal ve kanserli hücreler arasındaki farklılıkların, başlangıçta ve kanser progresyonu sırasında ortaya çıktığını göstermektedir. Bu değişiklikler tek bir ya da birden fazla modifikasyonla ilgili olabilmektedir. İnsan proteinlerinin %50'sinden fazlasının glikolize olduğu, bunun ötesinden anne sütü gibi bazı biyolojik sıvılar için bu oranın %80'lere çıktığı tahmin edildiğinden glikozilasyon büyüklük ve oluşum hızı bakımından tartışmasız olarak en önemli PTM grubudur. Glikanlar çoğunlukla hücre yüzeyindeki ve hücre dışı matristeki proteinlere bağlı bulunurlar ve burada birçok biyolojik faaliyete aracı olurlar. Proteinler, FDA tarafından kanser biyobelirteci olarak en çok onaylanan biyomoleküllerdir ve bunların büyük bir kısmı glikoprotein yapısındadır. Meme kanseri için buna bir örnek özellikle hastalık teşhisi konulmuş vakaların izlenmesinde oldukça etkili bir molekül olan CA 15-3'tür. Benzer şekilde kolon, kan, meme, pankreas ve akciğer kanserinde değiştiği belirlenen Karsinoembriyonik antijenleri (CEA) yüksek derecede N-glikozile haldedir.⁵

Tek bir protein biyobelirteci genellikle hastalığın teşhisi için yeterli özgünlük ve hassasiyeti sağlayamadığından, birbirinden bağımsız potansiyel belirteçlerin kombine halde analizi yaygın bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir biyomolekül grubunun doğru ya da ters orantılı olarak değişimi kanser prognozu açısından anlamlı olabilir.

Glikoprotein analizinde Matriks-Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonlaşmalı - Uçuş Zamanı/Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF/MS) ve elektrosprey iyonlaşmalı kütle spektroskopisi (ESI – MS) sahip oldukları seçicilik ve hassasiyet bakımından glikan yapılarının analizinde en çok kullanılan yöntemlerdir. Ancak bir HPLC sistemine bağlı floresans ve refraktif index detektörlerle yapılan çalışmalarda mevcuttur.⁵

Bu doktora tezinin amacı, formalinle sabitlenmiş parafine gömülü doku örneklerindeki N-glikan yapılarının glikomiks yaklaşımıyla ve iki farklı yöntemle analiz edilmesidir. Bu kapsamda yeni ekstraksiyon ve saflaştırma teknikleri denenerek optimum koşulların geliştirilmesi planlanmıştır. Çalışmanın bir diğer amacı N-glikanlara ve N-glikanları kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre ayıran 23 farklı N-glikan grubuna ait ölçüm değerlerinin kanser-kontrol ve kanser derecesi-kontrol örneklerinde istatistiksel olarak karşılaştırmaktır. Sonuçta farklılık gösteren yapılar arasından kanserli-kontrol örneklerinin tam olarak birbirinden ayırabilen potansiyel biyobelirteç modelinin tanımlanması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genomik Veriler Işığında Proteomiks ve Glikoproteomiks

2.1.1. İnsan Genom Projesi ve Sonuçları

Canlı hücrelerin işleyişinde etkili olan birçok karmaşık etkileşimi yerine getirmek amacıyla hücresel biyolojinin operasyonel öğeleri olan proteinler mRNA tarafından sentezlenirken, mRNA'lar ise DNA tarafından kodlanırlar. Crick tarafından ortaya konulan ve moleküler biyolojinin merkezi dogması olarak adlandırılan bu ifade genlerin aktiviteleri üzerine yapılan ilk tanımlamadır.⁴

Kısaca bir organizmanın ya da hücre tipinin tüm kalıtsal bilgileri olarak tanımlanabilecek olan genom terimi, bir organizmanın tüm genetik bileşenini tanımlamak amacıyla Hans Winkler tarafından 1920'de önerilmiştir. DNA'daki kimyasal bileşenlerin sırasının veya diziliminin belirlemesini sağlayan yöntemler 1970'li yılların ortalarında geliştirilmiştir. İlerleyen yıllarda genetik kodlama ve hastalıklar arasındaki ilişki üzerine yapılan araştırmalar hızla artmaya başlamıştır.⁴

1990 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) ve Enerji Bakanlığı, insan vücudundaki DNA'nın tamamı olan insan genomundaki 3 milyar kod ya da baz çiftine ait dizilim bilgilerini ortaya çıkartmak amacıyla uluslararası ortaklarla bir araya gelerek "İnsan Genomu Projesi" (İGP) adı verilen global bir çalışma başlatmışlardır. İGP başlangıçtan itibaren hedefleri doğrultusunda birçok karmaşık konuyu ele alan araştırma programlarını desteklemiş ve bu sayede insan genom dizisinin ve diğer birçok organizmadaki genomlarının karakterizasyonu moleküler biyolojinin kapsamında son yirmi yılda devrimsel nitelikte değişikliklere neden olmuştur. Otomasyon ve biyoinformatikteki teknolojik gelişmeler genomik olarak adlandırılan ve genler ve genomlar hakkındaki bilgilerin üretilmesi ve analizi olarak tanımlanabilen bir biyoloji

disiplini ortaya çıkmasını sağlamıştır. Kapsamlılık, veri odaklı incelemeler ve büyük ölçekli analitik bakış açısı genomik çalışmaları genetikten ayırmıştır.⁵

İGP, 1800'den fazla hastalık geninin keşfedilmesine katkıda bulunmuştur. Proje sonucunda geliştirilen ve hali hazırda kullanılan 2 binden fazla genetik test ve en az 350 biyoteknoloji temelli ürün şu anda klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Artık bir araştırmamanın tek bir gen veya küçük bir gen grubuyla sınırlanmasına gerek kalmamış, bir gen topluluğunun davranışı aynı anda sorgulanabilir hale gelmiştir.⁶

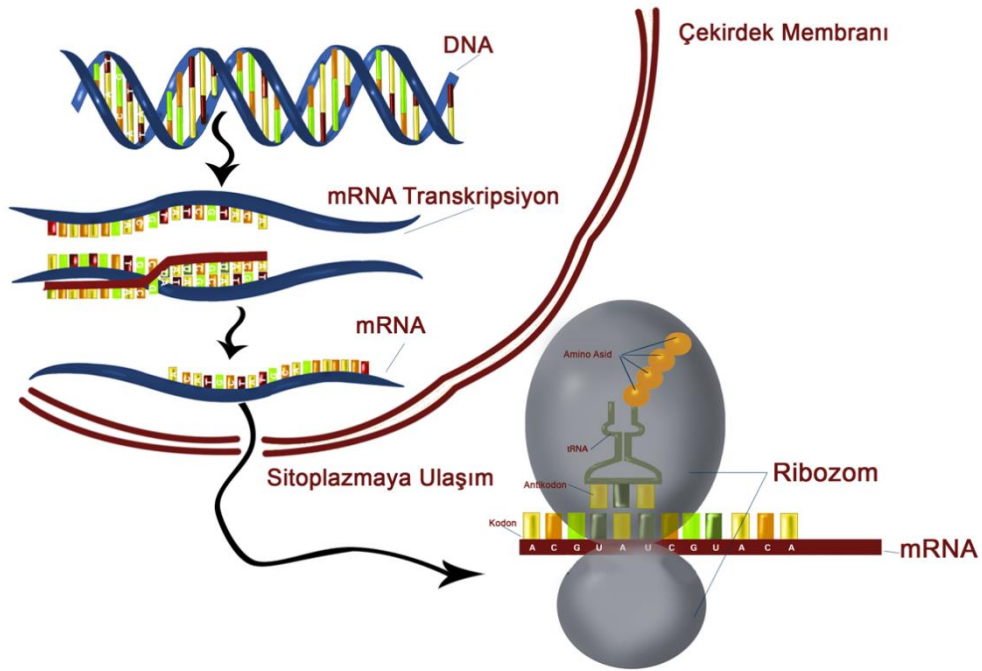
İGP'nin tamamlanmasının ardından organizmalardaki karmaşık yapıların aydınlatılmasında proteinlerin rolü odak noktası haline gelmiştir. Bunun nedeni aynı genoma ve yapıya sahip iki hücrenin ürettiği farklı proteinlerin keşfedilmesidir. Moleküler biyolojinin orijinal merkezi dogması, her bir genin tek bir proteinin sentezi için gerekli bilgiyi kodladığını belirtmekteydi. Ancak kütle spektroskopisi başta olmak üzere yüksek hassasiyetli ve doğruluklu ölçüm cihazlarının geliştirilmesiyle yapılan protein analizleri ökaryotik genlerin birincil RNA kopyasının birden fazla şekilde işleyebileceğini ve bir genin birden fazla proteini üretebileceğini açıkça ortaya koymuştur.⁷

2.1.2. Protein Yapısının Önemi ve Proteomiks Kavramı

Proteinler organizma içerisinde hücre içi ve hücre dışında genetik olarak taşınan birçok programı ve görevi yerine getiren makro-moleküllerdir. Boyutları 70 amino asitten (7000 Da veya 7 kDa moleküler ağırlıktan) 15000 amino asite (yaklaşık 1,7 mega Dalton moleküler ağırlığa) kadar değişmektedir. Yapıları birincilden dördüncüle kadar değişen proteinler, amino asit dizisinin birincil diziliminin katlanıp, spesifik bir fonksiyonu yerine getirebilecek üç boyutlu bir mimariye evrilmesi ile meydana gelirler (Şekil 2.1). Aminoasit monomerlerinin bu dizilimi proteini kodlayan gendeki DNA'nın nükleotid üçlü kodu üzerine kodlanmış halde bulunur. Bu kalıtsal bilgi DNA dilinden protein diline

mesajcı RNA (mRNA) aracılığıyla aktarılır. Yarılanma ömrü saatlerle ifade edilen kısa ömürlü bu biyomoleküller hayatın devamlılığını sağlayan bu dönüşümün baş aktörleridir. Zira mRNA'ların değişken stabilite ve dönüşüm sırasındaki değişken etkinlikleri, oluşturulan yeni proteinler üzerinde farklılığa neden olmaktadır.⁸

Genomdan esinlenilerek organizmalar, tek hücreli ve çok hücreli canlılar tarafından üretilen proteinlerin evrensel koleksiyonu proteom olarak adlandırılmıştır. Proteom terimi ilk kez 1994'te İtalya'nın Siena kentinde gerçekleştirilen 2D-elektroforez toplantısında kullanılmış, ardından hızlı ve yaygın bir şekilde kabul görmüştür. Proteomlar, genomun aksine organizmanın sabit bir özelliği değil, gelişim süreci, doku ve organizmanın da dahil olduğu çevresel koşullara göre değişim gösteren organizma içinde en karmaşık yapılardır. İnsanlarda potansiyel olarak 40.000 farklı proteini kodlayan 30.000 ila 40.000 civarında gen bulunurken, insan vücuduna özgü birbirinden farklı 2 milyon tür proteinin var olduğu tahmin edilmektedir.⁸

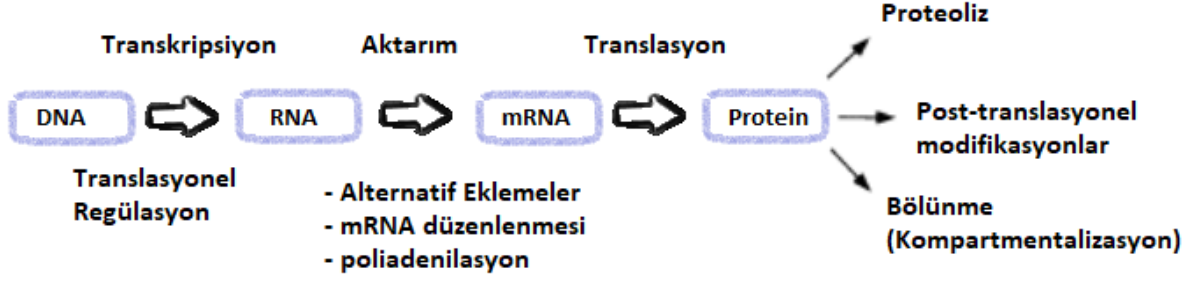


Şekil 2.1. DNA transkripsiyonu ile mRNA'ya aktarılan genetik bilgi ile hücrede gerçekleşen protein sentezi

2.1.3. Proteinlerde Post Translasyonel Modifikasyonlar

Biyolojik sistemler, hızla değişen çevreye dinamik uyum sağlayarak homeostazi sürdürürler. Transkripsiyon, dönüşüm (ve parçalanma) protein bolluğunu etkilerken, protein aktivitesi ve fonksiyonu esas olarak yapı tarafından belirlenir. mRNA'nın oluşumu, bir proteinin senteziyle sonuçlanan olayların uzun bir dizisinin sadece ilk adımıdır (Şekil 2.2). Sürecin ilk adımı moleküler biyolojide birleştirme olarak bilinen ve haberci mRNA molekülünün daha olgun bir başka mRNA'ya dönüşümü ile farklı proteinleri sentezleyen yeni mRNA'ların genetik kodlardan bağımsız olarak (alternatif ekleme, poliadenilasyon ve mRNA düzenlenmesi ile) oluşturulmasıdır. Ardından mRNA protein translasyon (genetik bilgi aktarımı) düzeyinde çeşitli düzenlemelere uğrayabilir. Son olarak protein bulunduğu çevresel şartlara bağlı olarak meydana gelen post-translasyonel modifikasyon olarak adlandırılan çeşitli yapısal değişiklikler kazanır. Translasyon sonrası nadiren görülen diğer iki değişiklik proteoliz ve bölündürme mekanizmalarıdır.⁹

Post translasyonel modifikasyonlar (PTM) yüksek substrat spesifik enzimler tarafından katalize edilen ve çeşitli biyomoleküllerin kovalent olarak bağlanmasıyla protein yapısında meydana gelen değişikliklerdir. PTM'lar biyolojik yapıya iç ve dış uyarılara karşı mili saniyeler içerisinde cevap verme yeteneğini kazandırır. Gen şablonuna dayalı olmayan proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları, protein aktivitesinde, hücrel konumlarında ve diğer proteinlerle olan dinamik etkileşimlerde değişikliklere neden olarak protein fonksiyonlarını düzenler. Bu nedenle PTM'ler, protein fonksiyonu üzerinde önemli bir düzenleyici mekanizma oluşturur (Şekil 2.2).¹⁰



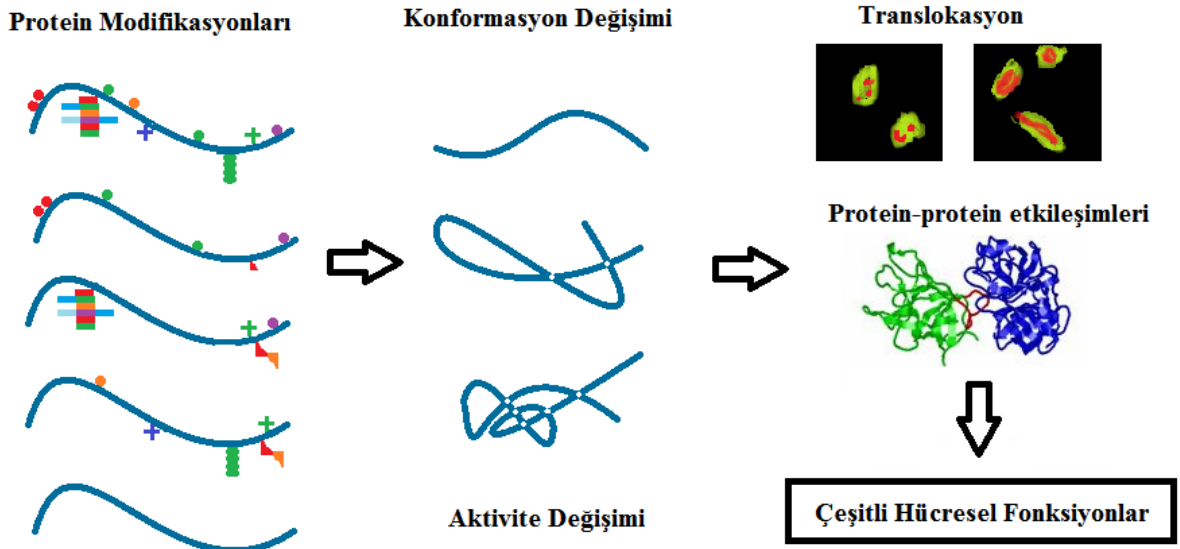
Şekil 2.2. Tek bir genin üzerinden birden fazla gen ürününe oluşmasını sağlayan biyolojik mekanizmalar.

Şu ana kadar 300'den fazla değişik PTM tipi bilinmekte olup yenileri düzenli olarak keşfedilmektedir. Protein dizileri ve işlevselliği hakkında önemli bir bilgi kaynağı olan UniProt veritabanına göre şu ana dek (Kasım 2016) 450'den fazla farklı PTM türü ile birlikte deneysel olarak kanıtlanmış, 45.000 modifikasyon bölgesi ortaya çıkarılmış ve PTM'ler hakkında deneysel bilgi içeren 22.000'den fazla makale yayınlanmıştır.^{11,12} PTM türlerinden 100 kadarı insan proteinlerinde görülmektedir. Bunların en yaygın olanları glikozilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, lizin asetilasyonu ve lizin metilasyonudur. Glikozilasyon, 4500 farklı proteinde tespit edilmiştir ve insan proteinlerinin %50'sinden daha fazlasında bulunmaktadır.^{13,14}

2.1.4. Protein Glikozilasyonu

Protein glikozilasyonu insan vücut sisteminde en sık görülen PTM türüdür. Glukan yapıları, protein fonksiyonu ve sinyal verme, protein stabilitesi, endositoz, hücre-hücre etkileşimi, oto-immünite, bağışıklık sistemi aktivasyonu, hormon ve sitokin hareketi, gen ifadesi ve tümör metastazı gibi proteinler ve lipidlerle ilişkili sayısız biyolojik ve fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol alırlar.¹⁵ Bu çeşitliliğin kaynağı kimyasal olduğu kadar aynı zamanda biyolojiktir. Hücrede endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi aparatındaki biosentetik-salgı yolunun kritik bir fonksiyonu olarak gerçekleşmektedir. Tipik olarak bir hücrede eksprese edilen tüm proteinlerin yaklaşık yarısı, spesifik amino

asitlere şeker parçalarının kovalent eklenmesini gerektiren bu modifikasyonlara maruz kalmaktadır.¹⁶



Şekil 2.3. Post-translasyonel modifikasyonlar sonucu protein fonksiyonununun değişimi

Protein glikozilasyonu hücrede çok önemli birtakım fonksiyonların yerine getirilmesini sağlarlar. Endoplazmik retikulumda meydana gelen glikozilasyon, protein katlanma durumunu izlemek için kullanılır ve yalnızca düzgün biçimde katlanan proteinlerin Golgi'ye taşınmasını sağlamak için bir kalite kontrol mekanizması gibi görev yaparlar (Şekil 2.3). Çözünür proteinler üzerindeki şeker parçaları, doğru hedefe ulaşmalarını kolaylaştırmak için trans Golgi ağındaki spesifik reseptörler tarafından bağlanırlar.¹⁶ Glikozidik bağlarla birbirine bağlı monosakkaritlerin dallanmış veya doğrusal zincirleri oligosakkarit yapılarını meydana getirirler. Proteinler üzerine kovalent olarak bağlanan bu büyük ve hacimli karbonhidrat formları proteinlerin aynı kökenli etkileşim alanlarına bağlanmasını kolaylaştıran veya önleyen protein-protein etkileşimlerine etki ederler. Hidrofilik oldukları için bir proteinin çözünürlük özelliklerini değiştirirler.¹⁷

Glikanların protein yapısına katılımı tipik olarak bir monosakkaritin hidroksil grubunun bir başka monosakkarite anomerik karbon atomunun oksijenle aralarındaki bağ durumuna göre α veya β konumunda kovalent olarak bağlanmasıyla meydana gelir. α ve β bağlama türü bileşim olarak aynı olan yapılarda bile glikoproteinlere çok farklı yapısal özellikler ve biyolojik işlevler kazandırabilmektedir.¹⁸

Glikozilasyonun proteom çeşitliliği üzerinde diğer herhangi bir PTM türüne göre çok daha etkili olmasının altında yatan ana neden dört farklı yönde değişiklik göstermesidir.

Bunlar;

- a. Glikozidik bağlantı- glikan (oligosakarit) bağlanma yeri,
- b. Glikan bileşimi-belirli bir proteine bağlı şekerlerin türleri ve sayıları,
- c. Glikan yapısı-dallı veya dalsız zincirler,
- d. Glikan uzunluğu-kısa veya uzun zincirli oligosakaritler olarak sıralanabilir.

Çok sayıda enzimatik aşama ile meydana gelen glikozilasyon en karmaşık PTM türü olarak nitelendirilmektedir. Transkripsiyon ve translasyon gibi hücresel olayların aksine glikozilasyon aşamaları kalıplaşmış bir süreç içermez ve bu moleküler olayların hepsi her glikozilasyonda meydana gelmez. Proses genel olarak enzimler tarafından kontrol edilir ve bu enzimlerin aktiviteleri hücre tipine ve hücre içi bölüme bağlı olarak çevresel şartlara göre değişir.¹⁹

Glikopeptid bağları, N-, O- ve C-bağlantılı glikozilasyon, glipifikasyon ve fosfoglikozilasyon da dahil olmak üzere, şeker-peptid bağının ve bağlı oligosakaritin doğasına bağlı olarak spesifik gruplara ayrılabilir. Majör glikan türleri; Asn-X-Ser / Thr (X prolin olmamalıdır) amino asit dizisinde asparajin yan zincirindeki azot atomuna bağlı N-Glikanlar ve serin ve treonin gibi birkaç amino asidin oksijen atomuna bağlı O-Glikanlardır.¹⁹

2.1.5. Glikoproteomiks ve Glikomiks

Glikomiks terimi, bir hücrenin veya dokunun belirtilen zaman, mekan ve çevre koşullarında ürettiği glikanların tam bir taramasını tanımlamak için tasarlanan çalışmaları tanımlamaktadır. Glikoproteomiks ise her glikoproteinde hangi bölgelerin glikozile edildiğini belirleyen ve hücredeki heterojen glikoformlar üzerindeki her bir glikan yapısının tanımlayan araştırmaları içermektedir.²⁰ Proteomda olduğu gibi her hücre metabolik olaylar tarafından yönetilen kendine has bir glikoma sahiptir. Ancak kombinasyonel olasılıklar her bir proteinin çoklu glikozilasyon bölgelerinde birden fazla glikanın olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla bir hücreye ait “tam” bir glikom profilinin belirlenmesi oldukça zorlu bir araştırmadır.¹⁸

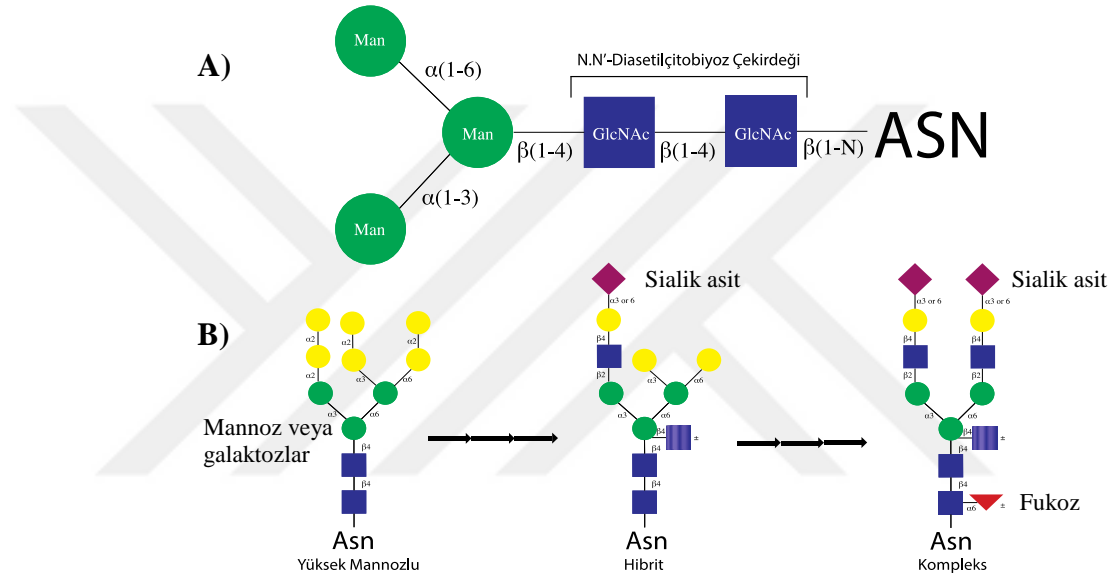
Glikanların hücre gelişme, kanser ilerlemesi, enfeksiyon ve diğer birçok hastalıkta değişen yapılar oluşturduğunun ortaya çıkması, glikanların bir bütün olarak (glikomiks) değerlendirilmesinin yanı sıra yalnızca bir glikan veya glikoproteinin spesifik olarak incelenmesi gerektiği fikrini geliştirmiştir. Glikanların hem genetik hemde çevresel faktörlerden etkilenmesi hem hastalık durumu hemde çevresel koşullar açısından türler arasında ilişki kurmak için karşılaştırmalı glikomiks araştırmaları yapılmasına imkan sağlamaktadır.²¹

2.2. N-Glikanlar

2.2.1. N-Glikanların Yapısı

N-glikanların asparjin amino asidine bağlandığı kısımdaki yanyana iki GlcNAc (N-N diasetilkitobioz) ile oluşturduğu mannozidik çekirdek tüm N-glikanlar için temel yapı olarak kabul edilir (Şekil 2.4-A). N-glikanların bir diğer özelliği proteinlere bağlandıktan sonra çok sayıda işleme basamağından geçerek oldukça farklı türlerde glikan yapılarına dönüşmeleridir.²²

N-glikan yapıları yüksek mannozlu, hibrit ve kompleks olmak üzere üç ana gruba ayrılır (Şekil 2.4-B). Bu gruplar fukoz (Fuc), siyalik asit (NeuAc), galaktoz (Gal), mannoz (Man), n-asetil glukozamin (GlcNAc) ve n-asetil galaktozamin (GalNAc) olmak üzere 6 tip şeker kombinasyonu ile oluşturulurlar (Tablo 2.1). Çoğu durumda, mannoz üç pozisyonda da bir N-asetil glukozamin (GlcNAc) parçası ile uzar. ²²



Şekil 2.4. N-glikan yapıları A) Yapısal gruplar B) Tüm N-glikanlara özgü çekirdek yapı


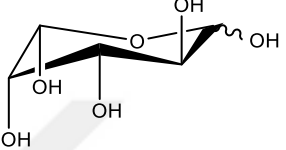

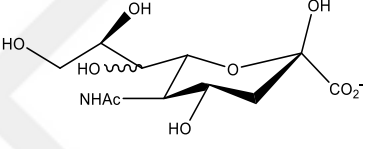

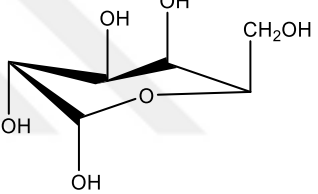

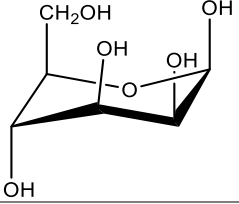

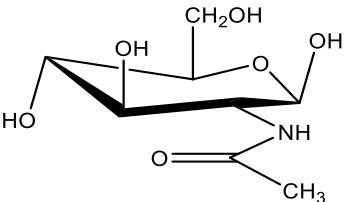

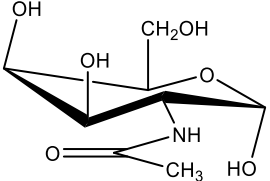
2.2.2. N-Glikanların Biyosentezi

N-glikan adını oligosakkaritin asparajin amino asidi üzerindeki karboksamido fonksiyonel grubunun azot atomuna (N-) kovalent olarak bağlanması nedeniyle almıştır. Diğer birkaç glikozilasyon türünde olduğu gibi N-glikanlar, yeni oluşan bir proteinin ER'ye taşındığı sırada eş-translasyonel olarak proteine bağlanırlar. ²³

Bir genomdaki bir DNA şablonu ile doğrudan ilişkili olan protein kompozisyonlarının aksine, glikan kompozisyonları sıklıkla rekabet eden bir dizi enzimatik glikozil transferaz reaksiyonu ile belirlenir. N-glikozilasyona etki eden dört

farklı mekanizma mevcuttur. Bunlar; öncü glikanın üretimi, yapıya bağlanma, düzenlenme ve olgunlaştırmadır. Başlangıçta her N-glikan aynı yolla üretilir ve farklılıklar düzenleme ve olgunlaştırma aşamasında ortaya çıkar.²⁴

Tablo 2.1. N-glikanları oluşturan oligosakkaritlerin sembolleri ve kimyasal yapıları

Kısaltma ¹	Kısaltma ²	İsim	Sembol	Kimyasal Yapı
F	Fuc	Fukoz		
S	NeuAc	Siyalik Asit (n-asetilneuraminik asit)		
H	Gal	Galaktoz		
H	Man	Mannoz		
N	GalNAc	n-asetil galaktozamin		
N	GLcNAc	n-asetil glukozamin		

Öncü molekülün türetilmesi aşamasında N-glikozidik bağlantılar yoluyla bağlanan oligosakkaritler, N-asetilglukozamin (GlcNAc), mannoz (Man) ve glukozdan (Glc) oluşan

14 şeker çekirdek yapıyı oluştururlar. Bu şekerler ardışık olarak ER membrana gömülü bir poliizoprenoit lipid taşıyıcı olan dolikol üzerine ilave edilir. İlk 7 şeker sitoplazmada şeker nükleotidlerinden elde edilir ve bir pirofosfat bağı ile dolikole bağlanırlar. Man5GlcNAc2-PP-dolikol ara maddesi tamamlandıktan sonra tüm kompleks ER'nin lümenine çevrilir ve Man- ve Glc-P-dolikol moleküllerinden alınan son 7 şeker ile Glc3Man9GlcNAc2-PP-dolikol öncü glikan yapısı oluşturulur.²⁵

Öncü N-glikanın proteine bağlanması ER içerisinde yeni oluşan protein üzerinde meydana gelir. Oligosakkaritler hem ER hem de Golgi'de hidroliz yoluyla kesilerek glikozidazlara dönüştürülür. Ancak ER ve Golgi'de yapılan düzenlemeler birbirinden farklıdır. ER'deki şeker hidrolizi hem proteinin katlanmasını hem de proteinin ne zaman parçalanacağını belirler. Glc ekleme ve çıkarmadan oluşan enzimsel döngü, protein doğru şekilde katlanıncaya ve bir sonraki işleme için Golgi'ye intikal edene kadar devam eder. Glikozilasyon sırasında bu noktaya kadar, tüm N-bağlantılı glikoproteinler aynı öncül glikan yapısına (Man9GlcNAc2) sahiptir.²⁵

Golgi aparatındaki glikan olgunlaştırma işlemi her adım önceki basamağa bağlı olacak şekilde yüksek derecede bir düzene sahiptir. Bu kademeli işlemi kolaylaştırma için Golgi salgıladığı spesifik enzimleri farklı gruplar halinde depo eder. Daha sonra kompleks, hibrit ve yüksek mannozlu türleri oluşturma üzere enzimsel aktivite başlatılır.²⁶

Kompleks oligosakkaritler olacak olan glikanlar, Golgi manosidaz I ve II enzimleri ile düzenlenir ve GlcNAc transferaz ile glikozile edilir, böylece ortak bir çekirdek bölge oluşturulmuş olur. Hibrit ve kompleks oligosakkaritler yüksek mannozlu türlerin modifikasyonu ile elde edilirler. Kompleks N-bağlı dallanmanın biyosentezi, GlcNAc (ler)'in çekirdek mannoz birimleri ile bağlanması ile ilerlemektedir. Buna karşılık, GlcNAc'ye bağlı dallanma, sıralı monosakarid ilavesi ile uzatılır.^{24, 25}

2.3. Meme Kanserinde Spesifik biyobelirteçler olarak N-Glikanlar

2.3.1. Meme Kanseri

Dünya çapında kadınlar arasında ölüm insidansı en yüksek olan sağlık problemi olan meme kanseri (göğüs adenokarsinoması), genel olarak kadınlarda menstrüasyon ile periyodik olarak gerçekleşen değişiklikler sonucu göğüs bölgesinde ortaya çıkan yumruların kötü huylu tümörlere dönüşmesi olarak tanımlanabilir²⁷. 2014 yılında Dünya Sağlık Örgütü – Uluslararası Kanser Araştırmaları ajansı tarafından İsviçre'nin Cenevre kentinde yayınlanan rapora göre tahmini olarak yılda 1.7 milyon yeni vaka (kadınlarda tüm kanserlerin% 25'i) ve 0.5 milyon kanser ölümü (kadınlarda kanser ölümlerinin % 15'i) meme kanseri sonucu gerçekleşmektedir.²⁸

Meme kanserleri küçük ve sınırlı bir tümörün oluşmasıyla başlar. Genellikle göğüs bölgesindeki lobüller (süt üreten küçük keseler) veya süt aktaran kanallarda görülse de, bölgedeki diğer dokularda (stroma, meme başı ve areola vb.) başlayan türleri de mevcuttur. Oluşan tümörlerin bir kısmı iyi huyludur yayılma eğilimi göstermezler. Malign (kötü huylu) olarak tanımlanan diğer tümörlerin metastaz yapma ve doku boyunca yayılma olasılıkları yüksektir. Meme kanseri tek bir hastalık türünden oluşmamaktadır ve hem klinik hem de morfolojik olarak heterojendir. Tümörün konumu ve tipine bağlı olarak tanımlanmış 20'den fazla meme kanseri alt tipi mevcuttur. Farklı meme kanseri türleri farklı oranlarda büyür ve yayılır; bazı türlerin meme dokusu dışına yayılımı yıllarca sürerken bazılarında bu birkaç hafta içerisinde gerçekleşebilmektedir. Göğüs bölgesinde oluşan herhangi bir yumruya derhal müdahale edilmesinin ve potansiyel kanser vakası olarak değerlendirilmesinin nedeni budur.²⁹⁻³¹

Çoğu meme kanseri türü epitel hücrelerden (karsinomdan) kaynaklanır; Bu tümörler *in situ* ve invaziv lezyonlar olarak birbirinden ayrılır. *In situ* karsinomlar, malin epitel hücrelerinin memenin duktal/lobüller iskeletine hapsedildiği pre-invaziv

lezyonlardır ve kanallar ve lobülleri çevreleyen bazal membran kanser hücreleri tarafından kısmen nüfus edildiği için bozulmamış durumdadır. Pre-invazif lezyonlar ayrıca duktal karsinoma in situ (DCIS) ve lobüler karsinom in situ (LCIS) alt bölümlerine ayrılır. "Duktal" ve "lobüler" olarak kullanılan terminolojiye rağmen, memedeki hemen hemen tüm karsinomların, terminal kanalı lobüler birimi olarak adlandırılan memenin yapısal ve işlevsel birimi üzerinden ortaya çıktığı bir süredir kabul görmekte olan bir hipotezdir.³² DCIS ve LCIS arasındaki ayrım, mikroanatomik kökenli bölgelerin (kanallar ve lobüller) değil, hücrelerin mimari ve sitolojik özelliklerinde bir farklılığın sonucudur. DCIS ve LCIS, göğüs içindeki dağılımları, ilgili iki taraflı hastalık riskleri ve doğal gelişim süreçleri bakımından da farklılık göstermektedir.³³

Özel alt tiplerin en yaygın görülenleri lobüler karsinom, tubüler karsinom, müsinöz karsinom, medüller ve apokrin özellikli karsinom, mikropapiller ve papiller karsinomlar ve metaplastik karsinomlardır^{31, 33, 34}

2.3.2. İnvaziv Duktal Karsinom

İnvaziv duktal karsinom (İDK) meme kanseri türlerinin en büyük alt kümesini oluşturur ve “özel olmayan tür” olarak adlandırılır. İDK özel türleri karakterize eden belirli morfolojik özelliklerle sınıflandırılmayan heterojen bir grubu tanımlar ve yayılma eğiliminde olan duktal kökenli tümör tiplerini temsil eder. Bu nedenle tümörlerin %70 kadarı bu gruba girer. İDK meme kanserinde diğer patolojik alt-tiplere göre daha az olumlu sonuçlara sahip olan türdür.³⁵

2.3.3. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler

Histopatoloji, meme kanseri örneklerinin rutin muayenesinde klinik araştırmalara önemli bilgileri sağlamakla görevli kritik noktadaki bir araştırma alanıdır. Meme kanseri oluşumunu takiben devam eden doğal seyiri, aynı tümör çapına sahip hastalar arasında

dahi farklılıklar gösterebilmektedir. Vakalar arasındaki bu klinik ve biyolojik davranış farklılıklarını ve yüksek risk gruplarını belirlemek için prognostik faktörler kullanılır³⁶. Meme kanserinde klinik tedavi en yüksek katkıyı sağlayan geleneksel prognostik faktörler;

1. Tümör boyutu
2. Deferensiyasyon (Farklılaştırma)
3. Histolojik tip
4. Histolojik derece (*grade*)
5. Lenf düğümü aşaması
6. Vasküler invazyonu (yayılımı) olarak özetlenebilir.³⁷

2.3.4. Meme Kanserinde Derecelendirme

Göğüs tümörlerinin hem tümör-içi (*intratumour*) hem de tümörler-arası (*intertumour*) heterojenitesi sergilediği iyi bilinmektedir. Histolojik derecesi, bir tümörün orijin dokusuna ne kadar yakından benzediğinin bir ölçüsüdür ve bir patoloji raporunun ayrılmaz bir parçasıdır. Mevcut derecelendirme sistemi tümörün üç parametresini değerlendirir. Bunlar;

1. yapısal farklılaşma derecesi (tübül oluşumu),
2. nükleer pleomorfizm (nükleer derece),
3. çoğalma (mitotik sayım / indeks)'dir.

Her parametre 1'den 3'e bir skorla verilir ve üç parametrenin skorları birlikte değerlendirilir. Toplam 3-5 puanı olan tümörler 1. derece (düşük dereceli), 6-7 puan 2. derece (orta dereceli), 8- 9 puan ise 3. derece (yüksek dereceli) olarak değerlendirilir. Bu semikantitatif yaklaşım birçok tümörde var olan intratümör heterojenliğini ortalama

olarak kabul etse de hasta prognozunun güçlü bir göstergesi olmaya devam etmektedir (Tablo 2.2).³⁸

Tablo 2.2. Meme kanserinde histolojik derecenin belirlenmesinde kullanılan yarı-kantitatif yöntemler ³⁸

Özellik	Derece
Tübül ve Salgı Bezleri Oluşumu	
Büyük tümör oluşumu (>%75)	1
Orta dereceli (%10-75)	2
Çok az ya da yok (<%10)	3
Nükleer Pleomorfizm	
Küçük, düzenli, tek tip hücreler	1
Boyut ve farklılıkta orta dereceli artış	2
Dikkat çekici farklılık	3
Mitotik Sayım	
Mikroskop alanına bağlı olarak	1-3
Final Derecelendirmesi	
Tübül ve salgı bezi oluşumu, nükleer pleomorfizm ve mitotik sayımlar için	
Sınıf 1	Toplam skor 3-5 aralığında
Sınıf 2	Toplam skor 6-7 aralığında
Sınıf 3	Toplam skor 8-9 aralığında

Histolojik derecelendirmenin histolojik tip ve östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) proteininin aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonu gibi desenlerdeki moleküler değişikliklerle güçlü bir ilişkiye sahip olduğu bilinmektedir.³⁵

Meme kanserlerinin histopatolojik analizi, hastalık evresi yani yayılma oranı hakkında bilgi verir. Bu bilgiye kanserin büyüklüğünden ve bölgesel lenf nodu yayılım oranının üzerinden karar verilir. Bu parametreler, tedavi yöntemi açısından güçlü bir prognostik bilgi sağlar. Hastalığın genel evrelendirmesi tümör-nodu-metastazı (TNM)

sınıflandırılması sistemi kullanılarak yapılır. Lenfovasküler permeasyon ve neoadjuvan tedaviye yanıt derecesi gibi ek prognostik veriler histopatolojik değerlendirmeden türetilir.³⁵

2.3.6. Biyobelirteç Kavramı

Biyolojik belirteçler (Biyobelirteçler) belli bir fizyolojik durumu kesin olarak tanımlayan biyolojik işaretlerdir. Bu işaret ölçülen bir veya birden fazla bileşenin sayısal veya görsel değeri olabilmektedir. Biyobelirteçler belirli bir hastalık durumunun taranması, tedavi altındaki hastaların izlenmesi, bir hastalık durumunun tekrar nüksetme ihtimalinin belirlenmesi ve hatta bir hastalığın oluşma riskinin yüksek olduğu kişi gruplarının belirlenmesi için kullanılabilir.² Biyolojik belirteçler için tarama yapılması, potansiyel indikatör analitlerin spesifik gereklilikleri karşılamaını sağlamak için kapsamlı bir araştırma gerektirir. Bir biyobelirtecin hastalık belirtisinin ne zaman var olduğunu (hassasiyet) veya olmadığını (özgünlük) tanımlayabilmesi beklenir. Çoğu potansiyel biyobelirteçler bu testi geçemez; yanlış pozitif veya negatif sonuçlara neden olurlar.^{39, 40}

Bugüne kadar kanser biyobelirteçlerinin keşfi amacıyla kullanılan yöntemler arasında DNA, RNA ve microRNA gen dizi analizleri ve protein mikroarray teknolojisi bulunmaktadır. Proteinler için 2D-gel elektroforez yöntemi kolaylıkla ulaşılabilir bir yöntem olarak sıklıkla kullanılmıştır. Bu yöntemlerin ortak özelliği zahmetli ve vakit alıcı prosesler olmasıdır. Kütle spektrometrisi biyolojik moleküllerin tanımlanmasında sahip olduğu çok yönlülükle jellerin önüne geçmiştir. Bugün yüksek bir popüleriteye sahip olan proteomiks, peptidomiks, metabolomiks, proteoglikomiks, glikomiks ve MS görüntüleme yöntemlerinin tamamı MS teknolojisinin bir eseridir³. Kanser biyobelirteçleri olarak aralarında tükürük, idrar, anne sütü, beyin omurilik sıvısı ve tümör intestinal sıvısında bulunduğu birçok biyolojik numune kullanılmıştır. Ancak invaziv risk taşımayan ve elde

edilmesi daha kolay olan insan serum ve plazma numuneleri en yaygın kullanılan numunelerdir. Serum ve plazma içerisindeki protein, peptid, metabolit, serbest DNA-RNA kalıntıları gibi analitlerin kanser teşhisinin en önemli hedef molekülleri olmasıdır. Bu durum proteomiks teknolojisi açısından elverişli gibi görünse de kandaki birkaç yoğun proteinin perdeleme etkisi ve PTM'ların varlığı bu bileşenlerin karakterizasyonunu güçleştirmektedir.⁴¹

2.3.7.Kanser Biyobelirteçleri Olarak Glikoproteinler

Biyolojik belirteç tayini çalışmaları proteinlerin tespit ve kantitatif tayin için kolay hedefler olduğunu göstermiştir. Bu yapılar, doğrudan tümör ve/veya tümörün bulunduğu mikro ortam hakkında bilgi verebilirler. Kan dolaşımı ve vücudun tüm dokuları ile teması sayesinde klinik analit kaynağı olarak kolayca elde edilebilir ve uygulamaya alınabilir. Ayrıca proteinler, hemen hemen tüm durumlarda genin efektör sonunu temsil ederler ve bilgi alışverişini daha da düzenlemek için eş zamanlı- veya post-translasyonel olarak modifiye edilirler. Bu nedenle proteinler kanser vakalarında genomik ve genetik materyallere göre daha fazla bilgi yükü taşımaktadırlar.⁴²

Proteinler, FDA tarafından kanser biyobelirteci olarak en çok onaylanan biyomoleküllerdir ve bunların büyük bir kısmı glikoprotein yapısındadır. Meme kanseri için buna bir örnek özellikle hastalık teşhisi konulmuş vakaların izlenmesinde oldukça etkili bir molekül olan CA 15-3'tür. Benzer şekilde kolon, kan, meme, pankreas ve akciğer kanserinde değiştiği belirlenen biyobelirteçlerin glikozilasyon bakımından zengin biyomoleküller olduğu görülmektedir. Örneğin karsino spesifik antijenleri (CEA) yüksek derecede N-glikozile haldedir⁴³⁻⁴⁵. Birçok farklı çalışmada potansiyel kanser biyobelirteci olarak bildirilen haptoglobin de glikozile bir protein türüdür.^{46, 47}

2.3.8. Kanserli Hücrelerde Glikozilasyon

PTM'lar protein biyosentezi sırasında bazı moleküllerin enzimatik olarak amino asitlere kovalent bağlanmasında ibaret olan bir mekanizmayı temsil ederler. Bölüm 2.1 'de bahsedildiği gibi PTM'lar proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına değerli ilave ayrıntılar sağlarlar. Bu değişiklikler, bir veya birden fazla modifikasyona bağlı olabilir. En yaygın PTM'lar glikozilasyon (N- ve O-bağlantılı) fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon, übikitinasyon ve sülfatasyondur.

İnsan proteinlerinin %50'sinden fazlasının glikozile olduğu, bunun ötesinden anne sütü gibi bazı biyolojik sıvılar için bu oranın %80'lere çıktığı tahmin edildiğinden glikozilasyon büyüklük ve oluşum hızı bakımından tartışmasız olarak en önemli PTM grubudur. Glikanlar çoğunlukla hücre yüzeyindeki ve hücre dışı matristeki proteinlere bağlı bulunurlar ve burada birçok biyolojik faaliyete aracı olurlar.^{48, 49} Yapılan araştırmalar PTM bakımından normal ve kanserli hücreler arasındaki farklılıkların başlangıçta ve kanser progresyonu sırasında ortaya çıktığını göstermektedir. Bu değişiklikler bir ya da birden fazla modifikasyonla ilgili olabilir.^{14, 50}

Kanser hücrelerinden salınan glikanların sağlıklı hücrelerdekinden farklı olduğunu gösteren önemli çalışmalar mevcuttur.^{51, 52} Tümörlerin belirli glikoprotein ve glikolipid tiplerini aşırı ifade ettiği bildirilmiştir. Ayrıca tümörlü dokularda N-glikanların boyutlarında ve dallarında bir artış olduğu, yüksek mannozlu türlerin kanser dokularda daha fazla eksprese edildiği genel bir kabul haline gelmiştir.^{53, 54} Çalışmalar incelendiğinde glikan analizi için birbirinden farklı birçok yöntemin kullanıldığı göze çarpmaktadır. Bu yeni yöntem arayışının nedeni glikan çeşitliliğidir. Glikan biyosentezinin şablon olmayan niteliği ve sentezleri sırasında birbiriyle rekabet eden çok çeşitli enzimlerin katılımı, küçük yapısal farklılıklara sahip fazla sayıda glikan molekülünün oluşumuna yol açmaktadır. Bu durum glikan analizlerinin proteinlere

kıyasla çok daha zor ve zahmetli olmasına yol açar.⁵⁵ Bununla birlikte glikanları bağıl miktarlarda tayin etmek daha kolaydır. Sıvı kromatografik ayırma, iyonizasyon ve kütle spektrometresi yöntemlerinde son gelişmeler, oligosakaritlerin kapsamlı bir şekilde tanımlanmasını ve daha büyük örneklem büyüklüklerinin yüksek verimle analiz edilmesini mümkün kılmıştır. Bu teknolojik gelişmeler potansiyel olarak glikanların spesifik kanser biyobelirteçleri olarak kullanılması fikrini güçlendirmektedir.⁵¹

2.4. Kanserde Formalinli Arşiv (FFPE) Doku Örnekleri

Kanser şüphesi ile histopatolojik değerlendirmeye alınan doku örnekleri için patoloji laboratuvarlarında kullanılan standart prosedür formalin fiksasyonu (sabitlemesi) ve parafin içerisinde gömülü hale getirilmesi işlemidir. FFPE adı işlemin İngilizce adının baş harflerinden (*formalin fixed paraffin embedded*) alınmıştır. Bu teknik dokunun çok ince kesitler halinde kesilmesine ve mikroskopik inceleme için bir slayt üzerine monte edilmesine olanak tanır. Aynı zamanda doku örneklerinin uygun bir formda ve zaman sınırı olmaksızın oda sıcaklığında muhafaza edilmesini sağlar.⁵⁶

Patoloji bölümleri ve araştırma enstitüleri FFPE doku bloklarını histopatolojik incelemeler için rutin olarak kullanırlar. Stok çalışma çözeltisi genellikle su içerisinde %4'lük formalinden ibarettir ve bu çözelti %40'luk formalin çözeltisinden seyreltilerek ve %10'luk metanolle stabilize edilir. Sabitleme işleminin ardından doku blokları dimetil-benzen (diğer adıyla ksilen) ve etanol serileri kullanılarak dehidrate edilir (susuz hale getirilir) ve parafin waksı olarak adlandırılan balmumu kıvamındaki parafin içerisine gömülür. Böylece doku blokları FFPE doku örnekleri haline getirilmiş olur.⁵⁷ Formalin doku içerisine nüfuz ettiğinde lizin, arjinin, histidin ve sistein de dahil olmak üzere çeşitli protein, amino asit kalıntılarının yanı sıra nükleik asitler ve polisakaritlerle de reaksiyona girer veya çapraz bağlar oluşturur.^{58, 59}

FFPE dokuların dondurularak saklanan doku örneklerine eşdeğerliği hali hazırda devam eden bir tartışma konusudur. FFPE dokular ile dondurulmuş doku örnekleri arasında karşılaştırılabilir verim olduğu görüşü oldukça yaygındır.⁶⁰ Bununla birlikte diğer birçok yayında doku tipleri⁶¹⁻⁶³ ve ekstraksiyon yöntemleri⁶⁴ için tekrarlanan karşılaştırmalarda değişkenlik olduğunu bildirmiştir. Ancak bu konuda kesin olan olgu, dondurulmuş dokuların kullanılması ile FFPE örneklere göre daha yüksek miktarda ekstrakte protein elde edilebileceğidir. Dolayısıyla –omik çalışmalarda kullanılan FFPE doku örneklerinden elde edilen ekstraktlar için daha hassas analiz yöntemlerinin kullanılması gerekir.⁶⁴⁻⁶⁶

2.4. FFPE Dokularda N-Glikan Analizleri

2.4.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması

FFPE dokularda protein ekstraksiyonunun ilk aşaması parafin veya yerine kullanılan polimerik maddenin çözdürülerek uzaklaştırılması (deparafinizasyon) işlemidir.⁶⁷ Çözünürleştirme işlemi apolar çözücüler kullanılarak yapılır. Ksilen bu amaçla en yaygın kullanılan çözücüdür. Bunun dışında heptan, oktan, toluen, mineral yağlar ve sıcak suda kaynatma gibi yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar olsa da hiçbirisi ksilen kadar güçlü bir uzaklaştırma sağlayamamıştır.⁶⁸⁻⁷⁰ Bunu takiben formalin fiksasyonu sırasında mevcut suyunu kaybeden doku, alkoller (metanol veya etanol) kullanılarak rehidratasyona maruz bırakılır.⁷¹

Rehidrate edilen doku örnekleri için bir sonraki adım doku yüzeyinde oluşan metilen köprülerini ve proteinlerin üç boyutlu yapılarını sağlayan hidrojen bağlarını kırarak proteinleri analize hazır hale getirecek olan denaturasyon işlemidir. FFPE dokuların çapraz bağlı yapısının aşılmasında proteolitik enzimler, nükleazlar ve denaturantlar da dahil olmak üzere kullanılan pek çok strateji mevcuttur.⁷² Ancak Shi ve ark.'nın 1991'de

geliştirdikleri FFPE doku örneklerinden ısı etkisi ile antijen geri kazanımı (HIAR) yöntemi bu konuda temel bir prosedürdür.⁷³ HIAR prosedürü FFPE dokunun 90-120 °C'de 10 dakikadan birkaç saate kadar ısıtılmasının ardından uygun bir tampon çözelti (örneğin çeşitli pH'lardaki tipik bir sitrat yada tris tamponu) içerisinde bekletilmesini içermektedir. HIAR yönteminin metilen köprülerinin yüksek sıcaklıktaki bölünmesini ve uygun bir tampon çözelti ortamı ve pH değerindeki protein denatürasyonunu teşvik ettiği düşünülmektedir.⁷⁴

2.4.2. N-Glikanların Glikoproteinlerden Ayrılması (Deglikozilasyon)

Glikozilasyon analizi için ortak yaklaşım, enzimatik veya kimyasal yollarla glikanları proteinlerden ayırarak gerçekleştirilen yöntemlerdir. N-glikan analizi sırasında deglikozilasyon teknikleri kimyasal ve enzimatik yöntemler olarak ikiye ayrılır.

a) Kimyasal Ayırım

Karbonhidrat kimyasının klasik bir yöntemi olarak N-glikanlar hidrazin ile glikoproteinlerden ayrılabilir. Bu yöntemin önemli bir avantajı sıcaklık kontrolü ile O- ve N- bağlı glikanların birbirinden ayrılabilmesidir. O-glikanlar 60 °C'de spesifik olarak ayrılırken N-glikanlar ayrımı için 95 °C'lik sıcaklığa ihtiyaç vardır. Yöntemin dezavantajı N-glikan ve asparajin arasındaki bağ ile birlikte reaktifin tüm amidik bağları kırması sonucu protein üzerinde ciddi değişimlere sebep olmasıdır.⁷⁵ Bir diğer yöntem glikanların amonyum hidroksit/karbonat ($\text{NH}_4\text{OH}/(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) yada sodyum hidroksit içeren alkali bir ortamda sodyum borohidrit (NaBH_4) kullanılarak β -eliminasyon ile ayrılmasıdır. N-glikanların bu yöntem ile ayrılması için sert alkali koşullar (1M NaOH ile 100 °C'de 6-12 saat) gereklidir. NaBH_4 serbest kalan glikan yapılarının bozulmasını önlemek için indirgeyici ajan olarak kullanılır.⁷⁶ Triflorometansülfonik asit (TFMS) hidrolizi glikan yapılarını ayırmak için kullanılan klasik yöntemlerden birisi olsa da daha çok protein analizlerinde kullanılır ve glikomiks çalışmaları için uygun değildir. Bunun nedeni TFMS

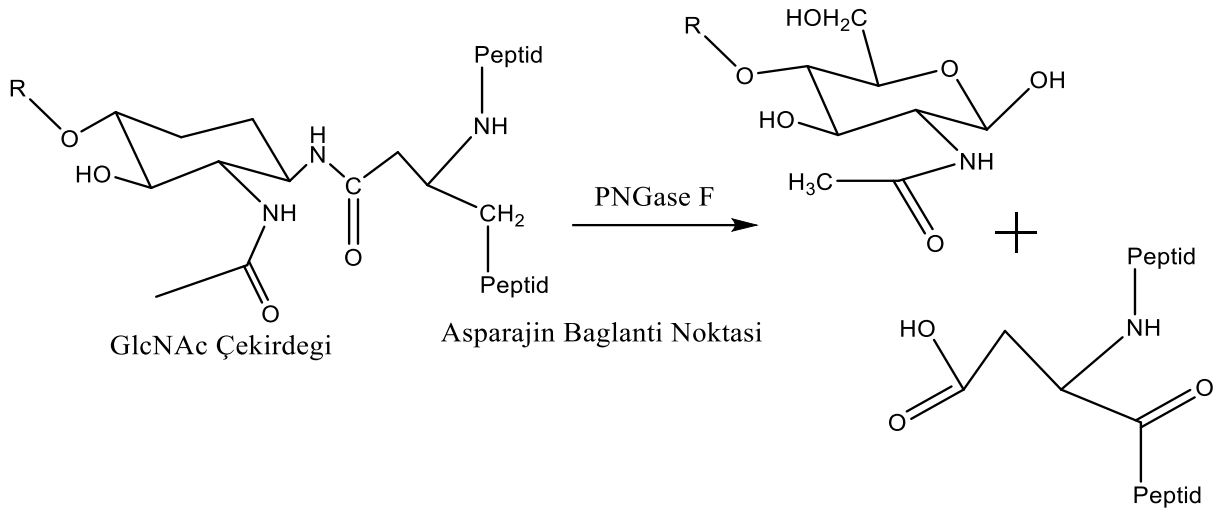
reaktifinin deglikozilasyonun ardından glikan yapılarını bozma ihtimalidir. Yöntem, genellikle enzimatik hidrolize dirençli olan bitki glikoproteinlerinin N-glikanlarını ortamdan uzaklaştırma için kullanılır.^{77,78}

b) Enzimatik Ayırım

Enzimatik reaksiyonla oligosakkarit yapılarının ayrılmasında en çok kullanılan enzimler endo- β -N-asetilglukozaminodaz (ENGase) olarak bilinen türlerdir. Bunların arasında da bilinen en etkili enzim PNGase F'tir. Reaksiyon koşulları altında inkübe edildiğinde N-glikan yapılarının neredeyse tamamını (asparjine bağlı N-asetilglukozamin molekülünde $\alpha(1-3)$ pozisyonunda fukoz içeren glikanlar hariç) proteinden ayırmayı başarır. Enzimatik reaksiyon sonucu ayrılan oligosakkarit yapılarının bozulmasına neden olmaz ve bu şekerin ayrıldığı asparajin ucu deamine edilerek aspartik aside çevrilir (Şekil 2.5). PNGase F, reaksiyon koşulları altında, en azından üç gün süreyle aktif kalır ve uzun süre glikoproteinlerin inkubasyonuna izin verir. Endoglikosidaz F1, F2 ve F3 türleri protein konformasyonuna karşı PNGase F'e göre daha az duyarlıdır ve doğal proteinlerin deglikozilasyonu için daha uygundur. ENGase enzim ailesinin üyelerinden Endo H, fukosilasyon içeren yapılarda kullanışlıdır.^{79,80}

N-glikan deglikozilasyonunda kullanılan bir diğer enzim türü ekzoglikozidazlar genellikle glikanların yerlerinin belirlendiği çalışmalarda kullanılmaktadır ve sterik etkiler nedeniyle endoglikozidazlar kadar etkili bir ayırma işlemi sağlayamazlar.⁸¹

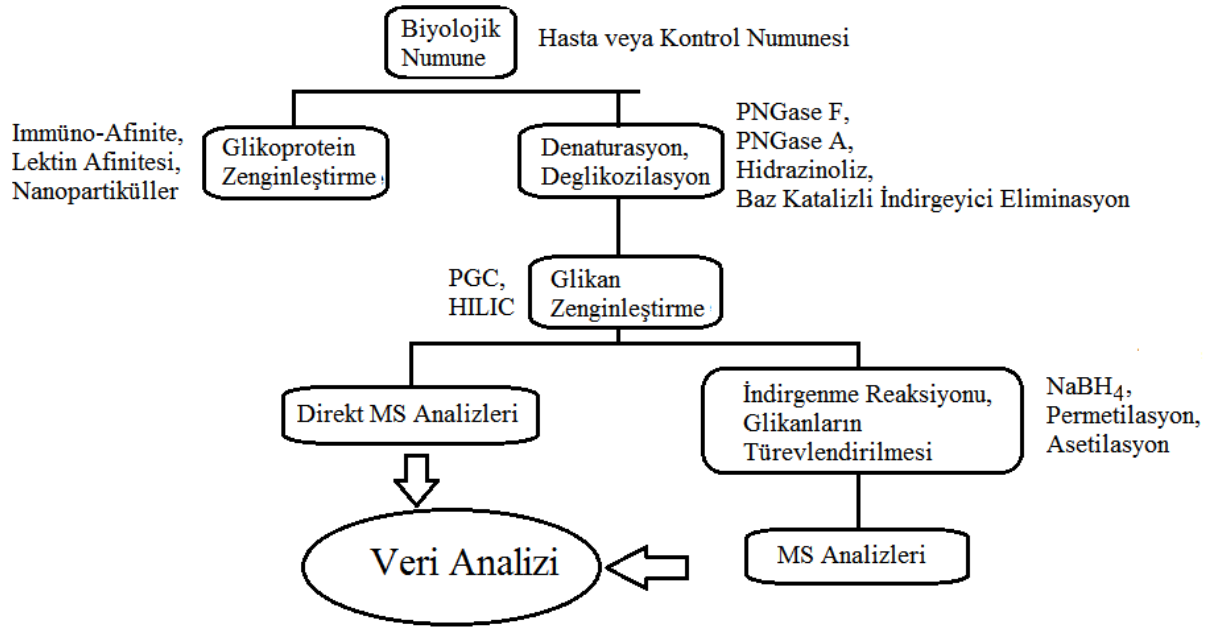
Ayırma işlemi için çoğunlukla saflaştırılmış proteinlerden veya biyolojik karışımlardan N-glikan bağlantılarını kesebilen peptid-N-glikozidaz F (PNGase F) enzimi kullanılır. Ancak ayırma için kullanılan daha farklı teknikler de mevcuttur. O-Glikanlar, bir β -eliminasyon reaksiyonunda alkalik sodyum borohidrit kullanarak proteinlerden ayrılabilirken, hem N- hem de O-glikanlar, hidrazinoliz kullanarak eşzamanlı olarak ayrılabilir (Şekil 2.5).⁸²



Şekil 2.5. N-glikanların glikoproteinlerden ayrılmasını sağlayan PNGase F enzimatik reaksiyonu

Bir sonraki adım, glikanların zenginleştirilmesidir. Zenginleştirme işlemi için genellikle gözenekli grafitlenmiş karbon (PGC) veya hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) kolonu üzerinde katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemi kullanılır (Şekil 2.6). Daha sonra, numuneler, MALDI-TOF, MALDI-Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (MALDI-FTICR), LC-IT-MS/MS, nanoLC-Q-TOF-MS gibi kütle spektroskopik yöntemler kullanılarak bileşimsel veya yapısal analiz olarak analiz edilebilirler.⁸²

Glikanlar kendi doğal yapılarında analiz edilebileceği gibi, özellikle yüksek çözünürlükte (örneğin bir PGC kolon kullanılarak) yapılan ayırma işlemlerinden sonra farklı glikan anometrik konfigürasyonlarına bağlı olarak MS spektrumunda ortaya çıkan fazla sayıdaki piki azaltmak için kimyasal olarak indirgenerek analiz edilebilirler. Kütle spektrometresinde tek tip iyonizasyon elde etmek için glikanlar permetilasyon ya da asetilasyon ile türevlendirilirler.⁸²

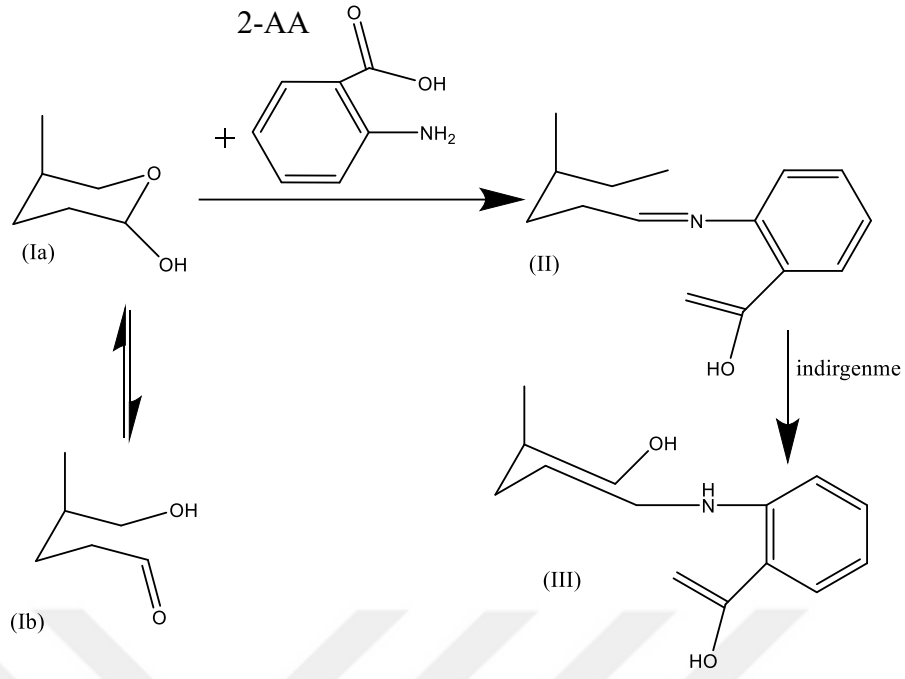


Şekil 2.6. Biyolojik numunelerde glikan analizi için genel prosedür

2.4.3. N-Glikanların Etiketlenmesi

Etiketleme reaksiyonları, glikoproteinler üzerinden ayrılan N-glikanların numune hazırlama işlemlerinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. N-glikanlara etiketleme ile floresans özellik kazandırılabilir. Ayrıca etiketleme ile indirgenen glikanların kimyasal olarak daha kararlı bir hale gelmeleri ve saflaştırma işlemi sırasında artan hidrofilik özellikleri ile verimin yükselmesi diğer avantajlarıdır.¹⁸

Glikanlar indirgeyici aminasyon reaksiyonu ile indirgeme uçlarından etiketlenebilir. Bu reaksiyonda birincil bir amin grubu içeren bir etiket, glikanın aldehit grubu ile bir yoğunlaşma reaksiyonunda tepkimeye girerek, bir ikincil amin verecek şekilde bir indirgeme maddesi ile indirgenmiş bir imin veya Schiff bazı üretecektir. Reaksiyon genellikle asetik asit içeren dimetil sülfoksit içinde gerçekleştirilir ancak tetrahidrofur ve metanol kullanılan alternatif yaklaşımlar bildirilmiştir (Şekil 2.7).⁸³



Şekil 2.7. N-glikanların 2-AA ile etiketlenme reaksiyonu

N-glikanların indirgeyici aminasyonu için kullanılan çeşitli etiket reaktifleri vardır. Bunlar arasında en yaygın şekilde uygulanan etiketler 2-aminobenzamit (2-AB), 2-aminobenzoik asit (2-AA), 2-aminopiridin (PA), 2-aminonaftalen trisülfonik asit (ANTS) ve 1-aminopiren-3,6,8-trisülfonik asit (APTS)'tir. 2-AB negatif yük taşımadığı için kromatografik analizlerde yaygın olarak kullanılan bir etikettir. PA, HPLC analizlerinde yaygın olarak kullanılır ve standardize edilmiş elüsyon koşullarında yapısal profillemeye için geliştirilmiş bir veri tabanına sahiptir. 2-AA reaktifi negatif yük taşır ve etiketleme ile glikanı çok yönlü bir hale getirir. Bu sayede HPLC ve kapiler elektroforez (CE) analizlerinde hem siyallenmiş hem de nötr türlerin analizine imkân tanır. Aynı zamanda matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) analizlerinde hem pozitif hem de negatif modda analiz yapılmasını sağlar. APTS etiketi de benzer şekilde negatif yük taşır ve CE analizleri için çok uygundur. Ancak taşıdığı 3 negatif yük MALDI ile APTS etiketli N-glikanların analizini zorlaştırmaktadır.⁸³ Glikanların indirgeyici ucunun alkali koşullarda 1-fenil-3-metil-5-pirazolon (PMP) gibi ayraçlarla etiketlenmesi

aminasyon reaksiyonlarına özgü asidik koşullardaki siyalik asitlerin kaybolma ihtimalini ortadan kaldırır. Bu etiketleme yöntemi “Michael ilavesi” olarak adlandırılır.⁸⁴

Bir başka etiketleme prosedürü, bir hidrazid molekülünün uç grubunun glikanlarla reaksiyonu yoluyla gerçekleştirilir. Hidrazid etiketleme kromatografik ve kütle spektroskopik tekniklerin kombine halde kullanıldığı yöntemlerde avantajlıdır.⁸⁵

Hidroksil grupları, amin grupları ve karboksil gruplarındaki hidrojenlerin, bir hidrofobik şeker türevi veren metil gruplarıyla değiştirildiği etiketleme türü olan permetilasyon, hem ESI hem de MALDI ile N-glikanların sinyal gücünü artırdığı için avantajlıdır. Permetilasyon spektral yorumlamayı kolaylaştırır, çünkü asial ve nötral yapılar pozitif iyon modunda, siyalik asitler prosedür sonrasında stabilize edildiğinde ölçülebilir. Ayrıca, permetile glikanların sodyum ekli iyonları MS/MS sistemlerinde bağlantı pozisyonları hakkında detaylı bilgi sağlar.^{86, 87}

2.4.4. N-glikanların Saflaştırılması ve Zenginleştirilmesi

Saflaştırma işlemi etiketlenen glikanların analizlerinde önemli bir adımdır. Saflaştırma numune çözeltisindeki mevcut biyolojik kalıntıları, tamponu ve tuzları elimine etmekle kalmaz, aynı zamanda mevcut etiketleme reaktifinin fazlasının çözeltiden uzaklaştırılmasını sağlar. Bu sayede kromatografik yöntemlerde meydana gelebilecek girişimler önlenir ve kütle spektroskopik tekniklerde özellikle tuzlardan kaynaklanan iyonlaşma problemleri bertaraf edilebilir.⁸⁸

Etiketli N-glikanların saflaştırılmasında kullanılan stratejiler beş ana grupta toplanabilir. Bunlar katı faz ekstraksiyon (KFE) yöntemleri, sıvı-sıvı faz ekstraksiyon yöntemleri, jel filtrasyon, kağıt kromatografisi ve çöktürme esasına dayalı saflaştırmalardır. Uygulanacak yöntem etiketleme türüne, numune matriksinin karmaşıklığına ve istenilen saflık derecesine göre değişiklik göstermektedir. KFE ve kağıt kromatografisi

genellikle indirgeyici aminasyon ve hidrazid etiketlemesi sonrasında gerçekleştirilir. Buna karşılık sıvı-sıvı ekstraksiyonu, permetilasyon ve Michael ekleme yöntemleri sonrasında tercih edilen yöntemlerdir. Permetilasyon prosedürlerinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu takiben C₁₈ tipi KFE kartuşları ile geri kazanım artırılabilir. Aseton ile çöktürme işlemi tuzları uzaklaştırmadığı için yaygın olarak uygulanmaz, ancak proteinleri uzaklaştırma için kullanılabilir.^{88, 89}

KFE için kromatografik yöntemlerde sabit fazlar kullanılabilir. Ters fazlı kromatografik sistemlerde gözenekli grafitlenmiş karbon (PGC), HILIC ve anyon değişim kromatografisi kolonları sıklıkla kullanılmaktadır. HILIC kolon özellikle aminlenmiş glikanların saflaştırılması için uygun olan bir yöntemdir. Bu yöntemde glikanlar hidrofilik özellikleri sayesinde kolona tutunurken, daha az hidrofilik olan etiketleme ajanı fazlalığı elüe edilir.^{88, 89}

2.4.5. N-glikanların için Enstrumental Ayırma Yöntemleri

İzomer yapıları birbirinden ayırmak ve interfere etkilerin uzaklaştırıldığı iyi bir saflaştırma yapmak mümkün olduğunda peptidlerden uzaklaştırılmış serbest haldeki glikanlar (etiketli veya etiketsiz) ideal analitlerdir. N-glikanlar için kullanılan modern enstrumental yöntemler, bir ayırma yöntemi ile veya ayırma yöntemi olmaksızın yapılan dedeksiyon ile yapılan birçok hibrit modelden oluşmaktadır.⁹⁰ Bu bölümde ayırma ve dedeksiyon yöntemleri ayrı ayrı ele alınmıştır.

N-glikan yapıları için mümkün olan ayırma yöntemleri sıvı kromatografik ve kapiler elektroforetik (CE) olarak iki grup altında toplanabilir.⁹⁰ ;

a) Kromatografik Yöntemler

Türevlendirilmemiş N-glikan yapılarının ayrılmasında kullanılan bir yöntem yüksek-pH anyon değişim kromatografisi (HPAEC)'dir. Yüksek elektrolit etkisi ile özellikle

kütle spektroskopisinde kirlilik dezavantajı nedeniyle çok tercih edilmemesine rağmen tuz uzaklaştırma hücrelerinin sisteme eklenmesi bu dezavantajı ortadan kaldırmıştır. Yakın bir zamanda bu alanda en çok kullanılan yöntem olması öngörülmektedir.⁹¹

Ters fazlı HPLC sistemleri (RP-HPLC) saf Glikan yapılarının fazlasıyla absorbe olması nedeniyle aminasyon ile türevlendirilmiş N-glikan yapıları için uygundur. 2-aminopiridin RP-HPLC analizleri için en uygun etiketleme ajanıdır. Ancak 2-aminobenzamid türevli N-glikanlar da bu yöntemle ayrılabilir.⁹²

Asetonitril (ACN) başta olmak üzere organik çözücülerin yüksek derişimleri ile polar sabit fazlar kullanılarak normal fazlı ve hidrofilik etkileşimli (HILIC) kromatografik yöntemler N-glikan analizinde sıklıkla kullanılırlar. HILIC kolonlar genellikle amid-türevli silika destek malzemesinde üretilirler. Çip-temelli HILIC ayırım daha yüksek doğruluk ve hassasiyetle analiz yapma imkanı tanır. HILIC kolonlar polar grupların sayısına ve büyüklüğüne göre ayırım sağlar. Bu sayede, öngörülebilir ve sezgisel olarak yorumlanabilir elüsyon modelleri ortaya çıkar. Ayrıca glikanlar üzerindeki her türlü doğal ve yapay modifikasyonu tolere ederler.⁹³

N-glikan ayırma yöntemlerinden bir diğeri PGC tipi kolonlardır. PGC'nin türevlendirilmemiş glikanları hapsetme özelliği 20 yıl önce keşfedilmiştir⁹⁴. Ancak yeni enstrumental tekniklerle bir arada uygulanması yüksek verimli ayırım gücünü bir kat daha öne çıkarmıştır. Mikro-akışlı cihazlarda hızlı bir analiz imkânı sağlar. Çip üzerine entegre edilmiş PNGase F reaktörü ile glikanların 10 dakika içerisinde glikoproteinlerden ayrılması ve analizinin gerçekleştirildiği bildirilmiştir⁹⁵. PGC kolonlar glikanlar güçlü bir şekilde hapseder. Elüsyon için bir miktar iyonik güce ihtiyaç vardır. Amonyum karbonat (pH 8 civarında) ve amonyum asetat (pH 9,6) tampon çözeltileri tetra-siyalil içeren N-glikanları elüe edebilir.⁹⁶

b) Kapiler Elektroferez Yöntemi

Kapiler elektroferez (CE) sisteminde borat tamponları ile floresan ajanla etiketlenmiş N-glikanların analizinden özellikle izomerik yapılarda yüksek seçicilik kazandırır. CE-Floresans dedektör cihazında DNA dizileme için kullanılan sistemler de glikanlar için yüksek verimli bir profillemeye yöntemi olarak kullanılmaktadır.⁹⁷

N-glikan için oldukça yeni olan bir diğer alternatif ayırma yöntemi, iyon hareketliliği kütle spektroskopisi (iyon-mobilite-MS)'dir. Yöntem farklı uzaysal uzantıya sahip izobarik glikanların birbirinden ayrılmasını sağlar.⁹⁸

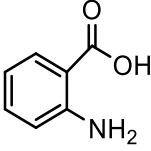
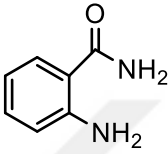
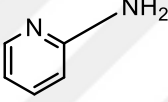
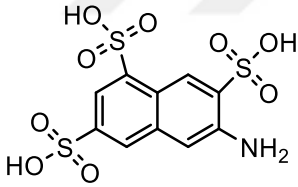
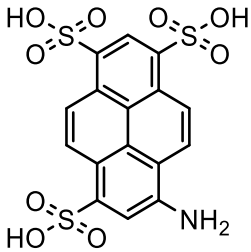
2.4.6. N-glikanlar için Dedeksiyon Yöntemleri

a) Floresans Dedektörler

CE ve HPLC sistemleri ile ayırımı yapılan glikanlar için floresans detektörlerle etkili şekilde analiz etmek mümkündür. Bunun en önemli nedeni floresan reaktiflerle etiketlenen glikanların UV-absorbans özellikli etiketlere göre 10 kat daha yüksek bir dedeksiyon limitine sahip olmalarıdır. Floresans etiketleme için Bölüm 2.4.3'te anlatıldığı üzere aromatik aminlerden oluşan bir dizi reaktif kullanılır. Bu etiketlerdeki amin grubunun fonksiyonu, indirgeyici aminasyon yoluyla karbonhidratları aldehit yapısında birleştirmektir. Elde edilen etiketli N-glikanların floresans intensitesi ve reaktivitesi moleküler yapıya ve reaksiyon koşullarına bağlıdır.⁹⁹ N-glikan analizlerinde en sık kullanılan floresans etiketler Tablo 2.3' te özetlenmiştir.

Genel olarak, aromatik halka/konjuge sistemin genişlemesi, hem eksitasyon hem de emisyon maksimumları daha uzun dalga boylarına doğru kaydırır (Tablo 2.3) ve floresan yoğunluğu azalır.¹⁰⁰

Tablo 2.3. N-glikanların etiketlenmesinde kullanılan floresans özellikli reaktifler

Floresans Reaktif	Yapı	Eksitasyon/Emisyon Dalga Boyları (nm)	Özellik
2-Aminobenzoik asit (2-AA)		330 – 420	Taşıdığı negatif yük ile hem nötral hem siyalik asit içeren yapılara uygundur. Daha yüksek intensite
2-Aminobenzamid (2-AB)		356 – 450	Negatif yükü var, HILIC ayırımı için uygun. Daha az safsızlık
2-Aminopiridin (2-AP)		320 – 400	Güçlü intensite, reaksiyondan önce zaman alıcı kristallendirme ön aşaması içerir
2-aminonaftalen trisulfonik asit (ANTS)		353 – 535	CE için uygun, hazırlanışı nispeten daha kolaydır.
1-aminopiren-3,6,8-trisulfonik asit (APTS)		488 – 520	CE için çok uygundur, MALDI'de iyonlaşması problemlidir.

b) Kütle Spektrometrik Yöntemler

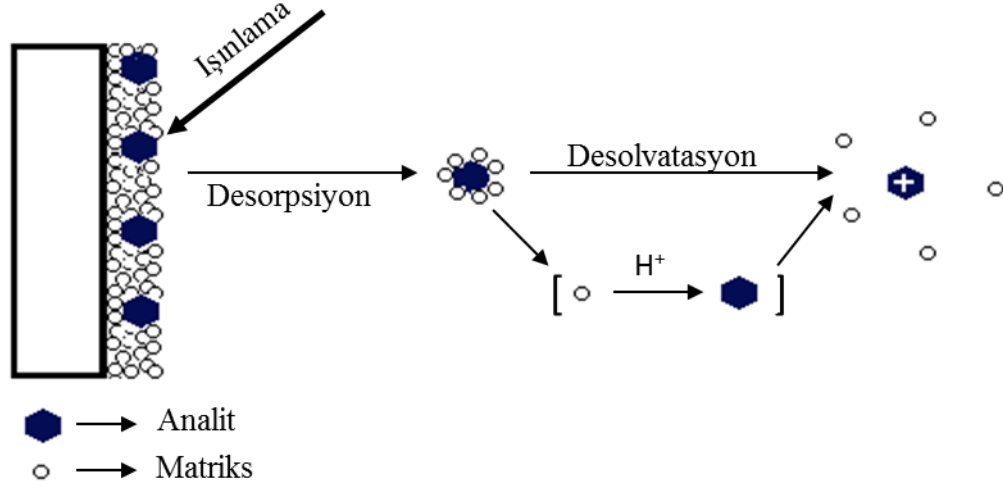
N-glikanların kütle spektroskopisi teknikleriyle analizinde iki iyonizasyon türü ön plana çıkmaktadır. Bunlar matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemleridir.⁸²

MALDI-TOF-MS uygun matriks kullanıldığında hem nötral oligosakkaritler için hem de negatif yüklü N-glikanlar için uygun bir yöntemdir. Her iki tipteki glikanların olduğu örneklerde, iyonizasyon problemi negatif yüklü bir etiket ile türevlendirme veya siyalik asitlerin karboksil gruplarının türetilerek nötral hale getirilmesi yoluyla çözülebilir. Siyalik asitler genellikle MS/MS analizi için daha fazla avantaj sağlayan permetilasyon ile nötr hale getirilir. N-glikanların MALDI spektrumu, yüksek kantitatif tekrarlanabilirlik sağlar ve genellikle HPLC sonuçlarına entegre edilebilir.⁸²

MALDI, bir matriks içerisinde kristalize edilen analitik lazer ışınları ile iyonlaştırılması esasına dayanan bir kütle spektrometrisi iyonlaştırma yöntemidir. Hem desorpsiyon hem de iyonizasyon sağlayan bir MALDI matrisinin kullanılması bu iyonizasyon yönteminin başarısı için çok önemli faktördür. Yöntem, kolay numune hazırlama ile farklılık yaratır ve tuzlar, tamponlar, deterjanlar gibi interfere etkilere karşı büyük bir toleransa sahiptir.⁸²

MALDI iyonizasyonu iki adımda gerçekleştirilir (Şekil 2.8). İlk aşamada, analiz edilecek bileşik veya bileşikler matriks adı verilen küçük organik moleküller içeren bir çözücü içerisinde çözündürülür. Bu moleküllerin lazer dalga boyunda kuvvetli bir absorpsiyonu olmalıdır. Bu karışım, analizden önce kurutulur ve solüsyonun hazırlanmasında kullanılan solvanlar uzaklaştırılır. Oluşan kristalize yapı matriks kristallerinin 'katı bir solüsyon' deposudur. Analit molekülleri matrisin her tarafına gömülürler, böylece birbirinden tamamen izole edilmiş olurlar. İkinci adım, kütle spektrometresi kaynağının içindeki vakum koşulları altında gerçekleşir. Katı kristal yüzeye gönderilen yoğun lazer darbeleri ile kristal yapıların ablasyonu (aşındırılmaları) sağlanır (Şekil 2.8). Bu sırada tek bir noktada biriken yoğun enerji kristallerin hızlı bir şekilde ısınmasını ve kristallerde lokal süblimasyona matriksin gaz fazına genişmesine neden olur. Böylece matriks içine gömülü haldeki analit genişleyen matriks içerisinde gaz fazına sürüklenir. Gaz

fazındaki iyonlar daha sonra bir elektrostatik alan tarafından analizöre doğru hızlandırılır.^{101, 102}



Şekil 2.8. MALDI iyonizasyon diagramı

N-glikan analizinde en çok kullanılan matriks 2,5-dihidrobenzoik asit (DHB)'dir. Bunun nedeni düşük matriks etkisinin yanı sıra N-glikanların DHB içerisindeki kristallenme kabiliyetleridir. DHB için bir diğer alternatif süper DHB (S-DHB) olarak bilinen 2-hidroksi-5-metoksibenzoik asittir. Daha düzensiz kristal yapıları N-glikanlar için "hafif" bir desorpsiyon sağlar ve DHB ile siyalik asitli negatif yüklü N-glikanlarda görülen zayıf kütle spektrumu probleminin çözümü için kullanılabilir. Bunun dışında DHB ve türevi matriksler kadar yoğun kullanılmayan alternatif matriksler mevcuttur. Bunlar 3-aminokuinol, potasyum hekzasiyanoferrat-gliserol karışımı, higroskopik tetrabütülamonyum bromür, ferulik asit ve 2,5-dihidroksiasetofenondur.¹⁰³ ESI prensip olarak soğuk iyonlar üretir ve bu nedenle MALDI için tarif edilen siyalilatlı analitlerle ilgili komplikasyonları göstermez. Tüm glikanlar her iki iyonizasyon modunda iyonize olabilirler, ancak pozitif veya negatif iyonizasyon modunda ölçüldüğünde nötr ve

siyalillenmiş glikanların nispi yoğunlukları doğal olarak farklılık gösterir. MALDI 'nin aksine, ESI, tek yüklü alkali metal iyonları değil çift veya üçlü olarak yüklü protonlar üretir. Bu nedenle parçalanma yolları ve dolayısıyla bu iyon türleri için spektrumlar büyük ölçüde farklılık gösterir. Proton ekli iyonlar ile ortaya çıkan ve sodyumlu iyonlarla oluşmayan şekerlerin bir arada oluşması nedeniyle N-glikanların MS/MS spektrumları dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır.⁸²

Kütle spektrometrisinde kütle analizörleri için ayırt edici özellikler hassasiyet, kütle doğruluğu, çözünürlük, veri toplama hızı ve tek ya da çok kademeli (MS/MS) kütle spektrometrisine sahip olmaktır. ESI-MS, sınırlı çözünürlüğe sahip iyon tuzaklarına rağmen yararlı bir analizördür. Ancak Q-TOF ve alternatif iyonlaştırma seçeneği olan 'Orbitrap' ler çok daha yüksek bir çözünürlüğe sahiptir ve mevcutsa tercih edilirler. Modern Q-TOF'lar ve Orbitrap, fosfat ve sülfat gruplarının zorlu diskriminasyonuna izin veren ölçüm doğruluğunu ve çözünürlüklerini sunar. Bu durum N-glikan analizi için sınırlı derecede avantaj sağlar. Ölçümlerde oluşabilecek problemler genellikle deneysel tasarımda yapılan değişikliklerle çözülebilir. MS/MS sistemlerinde çarpışmaya dayalı parçalanma (CID) N-glikanların parçalanması için en uygun seçenek olarak görülürken, glikopeptidler için elektron yakalama veya transfer ayrılmasının (ECD ve ETD) yararlı olduğu kanıtlanmıştır.^{82, 102}

2.4.7. Meme Kanseri ve Diğer Vaka-Kontrol Örneklerinde N-Glikanların Biyobelirteç Potansiyeli Üzerine Yapılmış Araştırmalar

Meme kanseri ile glikan yapıları arasındaki ilişkinin ilk kanıtları büyük ölçüde meme kanseri hücre kültürleri ve cerrahi müdahale ile alınan tümör parçaları üzerindeki çalışmalarla ortaya konmuştur. Geçtiğimiz on yıl içerisinde oligosakkarit zincirine bağlanabilen monoklonal antijenlerle glikozilasyon yapılarının ümmihistokimyasal olarak incelenmesi, meme kanseriyle ilişkili glikan yapılarının aydınlatılması amacıyla

kullanılan önemli yöntemlerden birisidir. Bu yöntemle yapılan birçok çalışmada glikozilasyondaki değişimin hastalığın metastazı (yayılımı) ve prognozu (seyri) ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Handerson ve ark.¹⁰⁴ FFPE dokular üzerinde doku mikroarray analizleri ile yaptıkları çalışmada β 1,6 dallanmasına sahip oligosakkaritlerin meme kanseri lenf nodu metastazında artış gösterdiğini ve kanserin kötüye doğru gidişinin bir işareti olduğunu öne sürmüşlerdir. Madjd ve ark.¹⁰⁵ N-glikan yapısındaki iki farklı fukozlanmayı temsil eden Lewis y^b türü antijenin aşırı ekspresyonunun lenf nodu negatif meme karsinomalarında sağ kalımda azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Yine benzer bir çalışmada Nakagoe ve ark.¹⁰⁶ ABH/Lewis ilişkili antijenlerin meme kanserinde prognostik bir faktör olarak artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hakomori ve ark.¹⁰⁷ 1977 yılında yaptıkları çalışmada 21 adet hastaya ait cerrahi müdahale ile çıkarılmış gastrointestinal sıvısı ve tümör dokuları üzerinde glikolipitlerin analizlerini ince tabaka kromatografisi ve kütle spektrometresi ile gerçekleştirmişler ve sonuçta, hastalara ait doku örneklerinin çoğunluğunda Forssman antijeni olarak da bilinen glikofingolipid yapısının kimyasal ve üminolojik olarak bulunmadığını bildirmişlerdir. 1987 yılında Dennis ve ark.¹⁰⁸ hücre kültüründe immunohistokimyasal boyama ve SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirdikleri çalışmada siyalilasyonlu ve β 1-6-bağlantılı kompleks tip asparajine eklenmiş olan (N-glikanlar) oligosakkaritlerin kanserin oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırma grubunun yaptığı bir diğer çalışmada¹⁰⁹ insan tümör hücreleri üzerinde denenen yöntem ile N-bağlı oligosakkaridlerde β 1-6 dallanmasının GlcNAc transferaz V aktivitesinin dokuya spesifik regülasyonuna bağlı olduğu ve insan meme dokusunda artmış β 1-6 dallı oligosakkarid seviyelerinin hasta sağ kalım süresi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için daha ileri seviyeli araştırmalar yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmalarda N-bağlı glikan dallanmasındaki genel artışlar ve N- veya O-bağlantılı glikanların fukosilasyonu meme malignitesinde (tümör oluşumunda) yaygın olarak gözlemlenen durumlardır. Aynı zamanda bu değişimlerden sorumlu olan siyaliltransferazlar, fukoziltransferazlar, N-asetilglukosaminiltransferazlar ve galatosiltransferazlar gibi ilgili enzimlerin değişen ekspresyonu da çalışmalarda vurgulanmaktadır. Günümüzde bu enzimlerden bazılarının kanserli dokularda kesin olarak daha fazla eksprese edildiği kanıtlanmıştır ¹¹⁰⁻¹¹². Hatta bu enzimlerden biri olan N-Asetilgalaktozaminil transferaz-14 Wu ve arkadaşları tarafından meme kanseri prognozunda bir biyobelirteç olarak önerilmiştir. ¹¹³

Literatürde 2000'li yılların ortalarından itibaren biyolojik örneklerin toplam N-glikan profilleri ve biyobelirteç araştırmalarında kullanılan glikomiks tekniklerinin arttığı görülmektedir. Bu çalışmalarda farklı biyolojik örnekler üzerinde birçok numune hazırlama, analiz ve istatistiksel yaklaşım kullanılmıştır. Kütle spektroskopik analiz tekniklerinde MALDI başta olmak üzere LC-MS/MS ve LC-Q-TOF cihazları ile gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur. Huang ve ark. ¹¹⁴ 2-boyutlu elektroforez ve kütle spektroskopisi tekniklerini bir arada kullanarak 39 meme kanserli hasta ve 35 kontrol olmak üzere gönüllülerden temin edilen serum örneklerinde meme kanseri için biyobelirteç potansiyeli olan proteinleri araştırmak üzere bir analiz gerçekleştirmişlerdir. Örnekler yaş ve menopozal statülerine göre gruplandırılarak denaturasyon, saflaştırma ve zenginleştirme aşamalarından geçirilerek 2-boyutlu jel elektroforez sistemine yüklenerek ayırım işlemi gerçekleştirilmiştir. Protein ekstraksiyon seviyelerindeki değişen varyasyonlar bir jel görüntü inceleme yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Farklılık gösteren proteinler jel-içi sindirim yöntemiyle tripsin enzimatik parçalamaya maruz bırakılarak MALDI-TOF/TOF MS cihazı ile analiz edilmişlerdir. Kanserli numunelerde proapolipoprotein A-1, transferin ve hemoglobinin fazla miktarda regüle

olurken apolipoprotein A-1, apolipoprotein C-III ve haptoglobin $\alpha 2$ 'nin daha az miktarda olduğu bildirilmiştir. Elde edilen verileri doğrulamak için örnekler üzerinde rutin immunohistokimyasal testler uygulanmıştır. Sonuçların transferin miktarı için 2D-DIGE oldukça uyumlu olduğu ancak apolipoprotein A-I ve haptoglobinin rutin diagnostik testlerde tespit edilemediği bildirilmiştir. Yazarlar transferin seviyesinin meme kanseri numuneleri için biyobelirteç potansiyeline sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kirmiz ve ark.¹¹⁵ 2007 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada hücre kültüründen elde edilen meme kanserli hücrelerin sıçanlara transplantasyonun ile meme kanseri modeli uygulanmış sıçanlara ve kontrollere ait serum örneklerinin toplam glikan profillerini MALDI-FT-ICR MS yöntemiyle belirlemişler ve farklılıkların biyobelirteç potansiyelini genel bir istatistiksel yaklaşımla bir arada incelemişlerdir. Alınan serum örneklerindeki glikanlar kimyasal bir ayırma yöntemi olan β -eliminasyon kullanılmıştır. Elde edilen glikanların saflaştırma işlemi grafit karbon kolonun kullanıldığı bir katı faz ekstraksiyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. MALDI-MS analizleri 266 nm dalga boyundaki lazer iyonizasyonu ile 2,5-dihidrobenzoik asit matriksi kullanılarak yapılmıştır. Analiz sonucu elde edilen 4 kanseri ve 4 kontrol numunesine ait olmak üzere toplam sekiz kütle spektrumlarında her bir m/z oranına ait intensitenin sayısal değerleri temel bileşen analizi (PCA) yöntemiyle karşılaştırılmıştır. İstatistiksel modelin kanserli ve kontrol numunelerini başarılı bir şekilde sınıflandırdığı bildirilmiştir.

Meme kanseri numunelerinde N-glikan seviyelerinin biyobelirteç potansiyeli üzerine dikkat çekici bir çalışma 2008 yılında Kyselova ve ark.¹¹⁶ tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada farklı evrelerindeki 82 kanserli ve 27 sağlıklı bireye ait serum örneklerinde N-glikan yapıları deglikozile edilerek permatilasyonla türevlendirilip, MALDI kütle spektroskopisi yöntemiyle analiz edilmiştir. Glikopeptidler PNGase F enzimsel parçalamasına maruz bırakılarak aktive edilmiş C18 tipi bir mikro-kolondan elüe edilerek

saflaştırılmıştır. Elde edilen örnekler eşit miktarda 2,5-DHB makriksi ile karıştırılarak spotlanmış, ve 355 nm lazer ışınıyla ortalama 1000 lazer atışı ile iyonlaştırılmıştır. Sonuçlar ANOVA ve PCA (temel bileşen analizi) yöntemleriyle istatistiksel olarak incelenmiştir. İstatistiksel sonuçlara dayanarak bazı siyallenmiş ve fukozylanmış N-glikan yapılarının biyobelirteç potansiyeline sahip oldukları ileri sürülmüştür. Ayrıca kanser evrelerine ağırlık olarak N-glikan seviyelerinde niceliksel değişikliklerin ortaya konduğu bildirilmiştir. Sonuçta N-glikan yapılarındaki silasyon ve fukozilasyon artışlarının kanser progresyonunda bir gösterge olduğu ifade edilmiştir. Yapılan iki farklı istatistik testle 8 adet N-glikan yapısının (H5N3S1, H6N4F1S1, H6N5S2, H5N5, H6N5F1S2, H7N6F1S2, H6N5F1S3, H7N6S4) kanser-kontrol numunelerini birbirinden ayırabilecek biyobelirteç potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir.

Alley ve ark.¹¹⁷ meme kanseri hastaları ve kontrollere ait serum örnekleri için alternatif bir örnek hazırlama prosesi ile katı-faz türevlendirme sonucu elde edilen N-glikan yapılarının mikroçip temelli ayırımını ve kütle spektroskopik ölçümünü içeren bir yöntem önermişlerdir. Çalışmada öncelikle serum proteinlerinin çözünürlüğünü arttırmak amacıyla triptik parçalamaya maruz bırakılan serum örnekleri ardından PNGase F ile 37 °C'de 18 saat boyunca enzimatik reaksiyona maruz bırakılmıştır. Amonyum-boran kompleksi ile indirgenen bileşenler bir spin-kolon reaktörü kullanılarak metilasyonla türevlendirilmiş ve çip tipi kolonla ayırım sağlayan bir LC-MS/MS (chipcube-LC-MS/MS) cihazı ile analiz edilmişlerdir. İstatistik analizler (ANOVA ve ROC) sonucu N-bağlı 5 glikan için 0.05'den düşük P-değerleri ile anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Bunların arasından, monosiyalillenmiş iki-antenli bir N-bağlı glikan ve bir fukosilatlı trianten-trisiyalillenmiş bir yapı, 0.9'dan büyük AUC değerlerine dayanarak geç evre meme kanserinin potansiyel biyobelirteçleri olarak önerilmiştir. Ayrıca sonuçların

kanserli örneklerde Siyalilli glikan düzeyinde genel bir azalma ve fukozlanmış glikanların artan seviyelerini gösterdiğine işaret edilmektedir.

N-glikanların yapısal gruplar halinde değerlendirildiği ve serum örnekleri üzerinde yapılan çalışmalardan birisi de Leoz ve ark.¹¹⁸ tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kanser modeli uygulanan fare serumlarındaki glikoproteinlerden elde edilen N-glikanlar MALDI-TOF-MS ile meme tümörleri modelin başlangıcında, ilerleme aşamasında ve çıkarılmasında analiz edilmiştir. Alınan serum örnekleri denature edildikten sonra PNGase F ayırımına maruz bırakılarak etanolle çöktürme yoluyla protein karışımından ayrılmıştır. Katı faz ekstraksiyon tekniğiyle saflaştırılıp zenginleştirilen N-glikanlar 2,5-dihidrobenzoik asit matriksi içerisinde MALDI cihazında 355 nm lazer atışlarıyla iyonlaştırılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar m/z değerleri sırasıyla 1339,480 (Hex3HexNAc), 1485,530 (Hex3HexNAc4Fuc), 1809,639 (Hex5HexNAc4Fuc) ve 1905,630 (Man9) olan 4 N-glikan türünün kanser grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. Çalışmanın devamında hem fare hem de insan serum örneklerinde internal standart varlığında LC-Q-TOF yöntemiyle analiz edilmişlerdir. Her iki grupta kanserli örneklerin yüksek mannozlu N-glikan değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Özellikle m/z değeri 1905,630 olan yüksek mannozlu türün bir biyobelirteç potansiyeline sahip olduğu ifade edilmiştir.

2012 yılında An ve ark.¹¹⁹ fare ve insan pluripotent kök hücrelerinde toplam glikan profili analizlerini MALDI-TOF-MS yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Hücre kültürü örneklerinden hücre membranı ekstraksiyonu ile elde edilen glikoproteinler 100 mM amonyum bikarbonat ve DTT içerisinde 100 °C'de denatüre edilmiştir. PNGase F ile enzimatik olarak ayrılan N-glikanlar grafize karbon kolon ile saflaştırılmış ve zenginleştirilmiştir. DHB matriksi içerisinde 355 nm lazer altında iyonlaştırılarak tarama modunda analiz edilmişlerdir. Yazarlar çalışma sonuçlarının kanserli grup örneklerindeki

yüksek mannozlu glikanlarda artışı gösterdiğini ve yüksek mannozlu N-glikan yapılarının bir kanser kök hücre popülasyonunu temsil edebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Abbott ve ark.¹²⁰'nin gerçekleştirdiği bir meme kanseri biyobelirteç araştırmasında, meme kanserli hastaların tümörlü ve tümörsüz bölgelere ait doku örneklerinde triptik peptidler seviyesinde toplam proteom ve N-glikan analizi ayrı ayrı yapılmıştır. Triptik glikopeptidler üzerindeki N-glikanlar PNGase F ayrılmıştır. Ortamdaki kontaminantlar, tampon çözelti, tuzlar ve peptid kalıntıları Sep-Pak C18 kolonlarla ayrılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen numuneler LC-MS/MS cihazında m/z 500-2000 aralığında tarama modunda analiz edilmiştir. Glikoproteinler üzerindeki β - (1,6)-dallanma bölgesinden N-bağlantılı yapılara spesifik olarak bağlanan lektin fitohemaglutinin-L4 (L-PHA) boyası kullanılmıştır. Lektin normal sağlıklı hücrelerin aksine hastalığın invaziv karsinomaya geçmesiyle meme epitel hücrelerine seçici bir bağlanma göstermiştir. Söz konusu lektin boyama ile β -1,6-N-asetilglukozamin (β -1,6-GlcNAc) dallı N-bağlı glikan içeren glikoproteinlerin, invaziv duktal meme karsinomu teşhisi olan dört hastanın dokularında tespit edilirken normal sağlıklı kontrollerin dokularından elde edilemediği bildirilmiştir.

Literatürde N-glikan yapılarının değişik biyolojik numunelerde HPLC-FD yöntemiyle analizinin gerçekleştirildiği çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bir tanesi Abd Hamid ve ark.¹²¹ serum glikoproteinlerinin total N-glikan içeriklerinin kanserli ve hasta gruplarında karşılaştırmalı olarak inceledikleri çalışmadır. Serum örneklerinden PNGase F enzimi ile peptidlerden ayrılan N-glikan yapılarını HPLC-FD sistemine bağlı kütle spektrometresi ile ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir. Yazarlar üç-siyallillenmiş üç antenli ve α 1,3 bölgesinden fukozlanmış N-glikan türünün kanserli hücrelerde anlamlı şekilde artış gösterdiğini bildirilmişlerdir. Buna ek olarak ileri meme kanseri hastalarına ait serumlarda glikoproteomik çalışma ile glikan belirleyiciliğinin artmasına katkıda

bulunan akut faz proteinleri olarak α 1-asit glikoprotein, α 1-antikimotripsin ve haptoglobin β -zincirinin bir biyobelirteç olarak CA 15-3 'ten daha önce metastaz başlangıcını gösterdiği bildirilmiştir.

Saldova ve ark.¹²² meme kanseri hastalarının serum N-glikom profillerini tanımlamak ve kontrollerle karşılaştırmak amacıyla üç farklı analiz yöntemi (HILIC-UPLC-FD, HILIC-FD ve WAX-HPLC-FD) uygulamışlardır. Çalışmada kontrol numunesi olarak 107 sağlıklı gönüllü ve meme teşhisi konulan 62 hastaya ait serum örnekleri kullanılmıştır. Numunelerden alınan 5 μ L serum 96'lı SDS-jel bloklarında su ve ACN ile yıkanarak PNGase F ile enzimatik ayrımaya maruz bırakılmış ve ayrılan N-glikan yapıları 2-AB reaktifi ile indirgeyici aminasyon yoluyla etiketlenmiştir. 2-AB reaktifinin fazlası Whatman 3MM filtre kullanılarak kağıt kromatografisi tekniği ile ACN çözücüsünde saflaştırılmıştır. UPLC ile yapılan analizlerde 50 mM formik asit çözeltisi (pH 4.4) ve ACN'den oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40 °C ve akış hızı 0.56 mL/dk olmak üzere formik asit fazı %30'dan başlayarak giderek artan oranlarla bir gradient elüsyon uygulanmıştır. Floresans dedektör için eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 330 ve 420 nm olarak ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi 30 dk olarak belirlenmiştir. HILIC-FD yöntemi için bir TSKgel Amide 80 tipi kolon kullanılmıştır. Hareketli faz içeriği, dalga boyu UPLC yöntemi ile aynı olmak üzere kolon sıcaklığı bu yöntem için 30 °C'de sabit tutulmuştur. Toplam analiz süresi 60 dk. ve 180 dk. olan iki farklı gradient elüsyon uygulanmıştır. Zayıf anyon değişim kromatografisi (WAX) ile yapılan HPLC analizinde 50 mm uzunluğunda WAX özellikli kromatografik kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 0,5 M formik asit (pH 9,0) ve %10 metanol içeren su karışımının gradient elüsyon içerisinde formik asit çözeltisinin artan oranlarından oluşan fraksiyonları kullanılmıştır. Bu yöntem için toplam analiz süresi 35 dk. olarak belirlenmiştir. Pik alanları ANOVA testleriyle İstatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Çalışma sonucunda meme kanseri hastalarına ait serum örneklerindeki N-glikan yapılarında siyalilasyon, dallanma ve çekirdek dışı fukozilasyonunda kontrollere oranla genel bir artış görülürken, yüksek molekül ağırlıklı ve çekirdekten fukozlanmış iki anteni yapılarda azalma tespit edilmiştir. Ayrıca açıklanan analiz yöntemleri arasında UPLC temelli glikan analizi tekniğinin analiz süresindeki avantajının yanı sıra N-glikan yapılarının tespitinde diğer yöntemlere kıyasla daha başarılı olduğu ifade edilmiştir.

Melmer ve ark.¹²³ ilaç endüstrisinden rekombinant ilaçlar olarak üretilen terapötik glikoproteinlerin toplam N-glikan içeriklerini belirlemek üzere bir HPLC-FD yöntemi uygulamışlardır. Numune hazırlama aşaması PNGase F ile ayırım ve 2-AA reaktifi ile floresans etiketleme ve reaktifin fazlasının uzaklaştırılması için saflaştırma işlemlerini içermektedir. Etiketli glikanlar yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazında HILIC kolon ve floresan detektör ile analiz edilmiştir. Geliştirilen yöntemin doğruluğunu test etmek amacıyla antikor numuneleri lizil endopeptidaz enzimi ile parçalanarak elde edilen glikopeptidler RP-HPLC-MS cihazıyla analiz edilmiştir. Uygulanan iki yöntem arasındaki sonuçların tutarlılığının yöntemin güvenilirliğini gösterdiği ifade edilmektedir.

Knezevic ve ark.¹²⁴ 1008 bireye ait plazma numunelerinin değişkenliğini ve kalıtım derecesini ve aynı zamanda glikan yapılarını etkileyen temel çevresel belirleyicileri araştırmak üzere plazma glikanlarının analizini HPLC-FD yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. N-glikan yapıları PNGase F ile ayrılarak 2-AA reaktifi ile etiketlenmiş ve HILIC özellikli TSKgel amide 80 kolon ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Yöntemde kolon sıcaklığı 30 °C'de sabit tutularak 50 mM formik asit ve asetonitril hareketli fazlarıyla gradiet elüsyon yöntemi uygulanmıştır. N-glikan yapıları 33 kromatografik pik altında kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta bireysel glikanlar için kalıtsallık tahminlerinin çok düşük ile çok yüksek arasında değişen bir çeşitlilik gösterdiği, ancak diyet, sigara içme ve kolesterol seviyeleri dahil olmak üzere çevresel

belirleyicilerin tamamında istatistiksel olarak önemli etkilerinin tespit edildiği ifade edilmektedir.

Arnold ve ark.¹²⁵ 100 akciğer kanseri hastası ve yaş gruplarına göre eşleştirilmiş 84 gönüllü kontrol grubuna ait serum örneklerindeki N-glikan düzeylerini HILIC-FD yöntemi ile analiz ederek farklılık gösteren yapıların biyobelirteç potansiyeli üzerine bir değerlendirme yapmışlardır. Çalışmada PNGase F ile enzimatik ayırma maruz bırakılan N-glikan içeriği 2-AB reaktifi ile türevlendirmiş ve reaktifin fazlası kağıt kromatografisi yöntemiyle Whatman 3 mm kağıt kullanılarak asetonytril ile uzaklaştırılmıştır. HPLC analizleri TSKgel Amide-80 tipi kolonla 50 mM formik asit ve asetonytrilden oluşan hareketli faz kompozisyonu ile gradient elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Floresans dedektör için eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 420 ve 330 nm olarak belirlenmiştir. Pik alanları arasındaki farklılıklar R istatistik yazılım paketinde 50-50 ANCOVA/MANCOVA yöntemiyle belirlenmiştir. Kanserli numunelerde siyalil Lewis X, tek antenli glikanlar ve yüksek oranda siyalillenmiş glikanlarda artışlar tespit edilirken çekirdek-fukosillenmiş iki antenli glikanlarda azalmalar gözlemlendiği ve bazıları bunlardan bir kısmının erken evre vakalarda tespit edilebilir olduğu vurgulanmıştır. Yazarlar akciğer kanserinde erken evre vakaların prognozunda var olan problemlerin N-glikanların biyobelirteç olarak kullanılması ile aşılabileceği düşüncesinde olduklarını bildirmişlerdir.

Royle ve ark.¹²⁶ insan serum örneklerindeki N-glikan seviyelerini belirlemek amacıyla bir örnek immobilizasyonu adımı içeren yeni bir HPLC-FD yöntemi geliştirmişler ve yöntemi romatoid artrit hastalarına ait serum örnekleri üzerinde uygulamışlardır. Protein denaturasyonu ve PNGase F ile enzimatik ayırmadan sonra örnekler 2 mL hacmindeki polipropilen 96-gözlü plakada jel parçacıkları ile su ve asetonytril çözeltileri ile ikişer kez yıkanmıştır. Ardından 2-AB ile etiketlenen N-glikan yapıları HILIC-FD sisteminde TSKgel Amide-80 kolonla 50 mM formik asit çözeltisi ve

asetonitril mobil fazlarının bir gradient programı ile 180 dk. da gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aynı numuneler üzerinde yapılan MALDI-TOF-MS analizleri ile doğrulanmıştır. Geliştirilen yöntemin farmasötik fonksiyon ve stabilite için önemli olan glikan yapısı ve siyalilasyonun takibini sağlayabileceği ve üretim sürecinin tüm aşamalarında çok sayıda numunenin izlenmesine izin verecek şekilde, glikoterapötiklerin hızlı taranmasında kolaylıklar sağlayacağı vurgulanmaktadır.

Ruhaak ve ark.¹²⁷ plazma toplam glikoprotein havuzundan elde edilen glikanların kalıtsal uzun ömürlülüğe işaret edip etmediğini araştırmak üzere sağlık durumlarına göre gruplandırılan gönüllerin plazma örneklerinde N-glikan analizi yapmışlardır. Çalışmada 2396 orta yaşlı katılımcının toplam plazma N-glikan profilleri, PNGase F enzimsel glikan salınımı, 2-AA reaktifi ile etiketleme ve ardından floresans detektörlü HPLC analizi ile elde edilmiştir. Kromatografik piklerin normalizasyonu ve toplu düzeltme yapıldıktan sonra glikan yapıları, bireylerin kalıtsal ömür değerleri ve sağlıklı yaşlanma arasındaki ilişkileri değerlendirmek için çeşitli regresyon stratejileri uygulanmıştır. İki yaşlı bireyin çocuklarına ait plazmalarda LC-7 ve LC-8 olarak kodlanan (H5N4 ve H4N4S1) iki N-glikanın kontrollere oranla daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu iki N-glikan yapısının kalıtsal ömrün artması ve kardiyovasküler hastalık riskini düşüşüne işaret ettiği bildirilmiştir.

Stanta ve ark.¹²⁸ 23 şizofreni hastası ve 31 kontrol olmak üzere 54 gönüllüden alınan serum örnekleri üzerinde farklılık gösteren N-glikanları belirlemek amacıyla bir HILIC-FD yöntemi ile analizi kullanmışlardır. Serum örneklerindeki N-glikan yapıları PNGase F enzimsel ayırımına maruz bırakılarak jel kromatografi yöntemi ile saflaştırılarak normal faz HPLC sisteminde TSKgel Amide 80 tipi kolonla analiz edilmiştir. 50 mM amonyum format çözeltisi ve ACN'den oluşan hareketli faz içeriğinin ACN oranı %65'ten başlayarak giderek düşürüldüğü bir gradient elüsyon uygulanmıştır.

Floresans dedektör için eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 420 ve 330 nm olarak ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi 180 dk olan yöntem ile toplam 23 adet N-glikan yapısı tespit edilmiştir. Pik alanları üzerinden yapılan istatistiksel değerlendirme ile dört antenli dört siyalil içeren N-glikanların erkek şizofreni hastalarının serumunda 2 kat artış gösterdiği ve SLex epitopunu içeren üç siyalilli N-glikanların erkek şizofreni hastalarında belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. N-glikozilasyon yapıları arasındaki bu değişikliklerin hastaların erken tanısı ve izlenmesinde potansiyel bir biyobelirteç olabileceği sonucuna varılmıştır.

2.5. Biyobelirteç Keşif Çalışmalarında Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

2.5.1. Hipotez Testleri

Hastalık durumu bilinen (hastalık var ya da yok) veri setleri istatistikte ikili (*Binary*) veri setleri olarak adlandırılırlar ve hastalığın varlığı ile ilgili değişkenler arasındaki ilişkiyi araştırmak için kullanılırlar.¹²⁹ Veri madenciliğinin ilk adımı, özellikle yüksek sayıda bağımsız değişkenden oluşan çok boyutlu veri setlerinde kategorik değişken (örn. hastalık durumu) üzerinde anlamlı bir etkisi olan nümerik değişkenleri (örn. Biyokimyasal ölçüm değerleri) belirlemek ve diğer değişkenleri dışlamaktır. Bu sayede gerçekte önemli bir etkisi bulunmayan değişkenlerin genel istatistiksel modellerde oluşturacağı “kalıntısız” (*residual*) etkileri elimine edilebilir. Gruplar arasındaki farkların anlamlı veya raslantısal olup olmadığını anlamak amacıyla hipotez testleri olarak bilinen sayısal algoritmik modellemeler kullanılır. Bunların arasında en çok bilinen ve uygulanan tür (*Student*) t-testleridir. İki bağımsız grup arasındaki t-testinin formülü;

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{SH_{X_1 - X_2}} \quad (2.1)$$

olarak ifade edilir. Burada pay, örnekler ortalamaları arasındaki farkı, payda ise aritmetik ortalamalar arasındaki farkın standart hatasını temsil eder. Bir veri seti üzerinde t-testi uygulanabilmesi için üç varsayımı karşılıyor olması beklenir. Bunlar;

1. iki farklı örneklem grubundaki bağımlı değişkenin varyanslarının eşit olması,
2. bağımlı değişkenin normal dağılım göstermesi,
3. veriler kendi arasında bağımsız olmalarıdır.

Bu üç şartı sağlamayan ve örneklem sayısı yetersiz ($n < 30$) olan veri setleri üzerinde t-testinin alternatifi olan *Mann Whitney U* testi, *Kruskal Wallis* testi veya *Wilcoxon Rank-sum* testi uygulanabilir.¹⁴²

2.5.2. Alıcı İşletim Karakteristiği (ROC) Analizi

Potansiyel biyobelirteçlerin tek başına ya da bir arada etkilerini araştırmak için istatistiksel sınıflandırma modelleri kullanılır.¹³⁰ Bunlar arasında lojistik regresyon¹³¹, karar ağacı¹³², alıcı işletim karakteristiği (ROC)¹³³ sıklıkla kullanılan yöntemlerdir.

ROC analizi biyolojik bir verinin tanı koymadaki gücünü değerlendirmede bir duyarlılık ve özgünlük değeri kullanarak değerlendiren bir istatistiksel yöntemdir.¹³⁴ Diğer tanı testlerinde olduğu gibi testin tanısallık yeterliliği kategorik verilerin doğru bir şekilde ayrılabilme kapasitesine bağlıdır. Tanısallık yeterlilik ölçütleri doğru pozitif ve yanlış pozitiflik oranları üzerinden ifade edilir. Tablo 2.4'te yeni bir ölçümün kullanılmasından kaynaklanan olası sonuçlar verilmektedir. Testin doğruluğu gerçek sonuçların tüm sonuçlara oranı $[(a+d)/(a+b+c+d)]$, duyarlılığı hasta bireyler arasından tespit edilebilen hasta sayısı $[a/(a+c)]$ ve özgünlüğü testin koşullarına sağlamayan bireyleri dışlama yeteneği $[d/(b-d)]$ ile ifade edilir. Binormal ROC modelinde sağlıklı bireyler ile hasta bireylerin iki farklı ortalama ve varyansa sahip ayrı iki normal dağılım gösterdiği varsayılır ve optimal kesim noktası (eşik değeri) bu iki eğri üzerinde sürekli

olarak değişen doğru pozitiflerin ve negatiflerin yanlışlara oranının en yüksek olduğu nokta olarak belirlenir.¹³⁵

Tablo 2.4. Yeni bir tanı testi sonucunda oluşabilecek muhtemel durumlar

Gerçek Yanıtlar		
Ölçüm Sonuçları	Pozitif	Negatif
Pozitif	Doğru Pozitif (a)	Yanlış Pozitif (b)
Negatif	Yanlış Negatif (c)	Doğru Negatif (d)

ROC eğrilerinde x eksenini 1-özgünlüğü y eksenini ise duyarlılık değerlerini ifade eder. Testin ayırım gücü ROC eğrisi altında kalan alan ile ölçülebilir. Eğrinin altında kalan alan değeri için 1 mükemmel bir ayırımı, 0.5 ise zayıf bir ayırımı temsil eder. Genellikle 0.9 ve üzerindeki değerlerin tanısal testlerde kullanma potansiyeline sahip olduğu öngörülür.^{136,137}

2.5.3. Korelasyon Analizi

İstatistiksel sınıflandırma modellerinde değişkenlerin ortak etkisi incelenirken birbirlerinden bağımsız değişimler göstermesi gereklidir. Aralarında bir korelasyon olan değişkenler istatistiksel modeli dengesiz hale getirir ve yanlış sonuçlara yol açar.¹³⁸ Değişkenler arasındaki korelasyonu belirlemek amacıyla Spearman, Kendall ve Pearson adı verilen üç temel korelasyon tekniği kullanılmaktadır. Spearman korelasyon testi non-parametrik bir istatistik yöntemidir ve iki değişken arasındaki değişimin monotonik ilişkisini inceler. Spearman korelasyon hesaplamasının genel formülü ;

$$P = \frac{6\sum d^2}{n(n^2-1)} \quad (2.2)$$

şeklindedir. Burada d_i , i gözlem sıraları arasındaki fark ve n gözlem sayısıdır.¹³⁹

2.5.4. Temel Bileşen Analizi

Değişkenler arasındaki bağımlılık yapısını yok etmek ve boyut indirgemek için kullanılan yaklaşımlardan bir tanesi temel bileşen analizidir (PCA). PCA değişkenlerin kovaryanslarından oluşan diagonal ve karesel matrisler üzerinde herbir değişkeni temsil eden özvektörlerin açısıl ilişkilerini inceleyen bir yöntemdir.¹⁴⁰ Kovaryans matrisi üzerinde en büyük değişim gösteren yön birincil eksen, birincil eksene dikey olan en farklı yön ikinci eksen olarak seçilir. Değişkenlerin en yüksek varyansı gösterdiği yönlenmeler seçilerek değişken sayısı kadar eksen belirlenir. Varyansı en yüksek olandan düşük olana doğru sıralanan bu eksene temel bileşenler adı verilir. PCA, bileşenleri verilerin değişimini en fazla açıklayan başlıyarak giderek azalan etkide olanları sıralar. Böylelikle veri üzerinde en etkili olan değişkenler görsel hale getirilebilir.^{141, 142}

2.5.6. Lasso Regresyon Analizi

En düşük mutlak daralma ve seçim operatörü (Lasso) parametre seçimi için kullanılan lineer bir veri daraltma yöntemidir ve regresyon katsayısı vektörünü (β) bir ℓ_1 normu ile cezalandırılır.¹⁴³ Lasso regresyonunun amacı, kantitatif bir yanıt değişkeni için tahmin hatasını en aza indirecek öngörücülerin alt kümesini elde etmektir. Lasso bunu model parametrelerine bir sınır (λ) koyarak bazı değişkenlerin regresyon katsayılarının sıfıra küçülmesini sağlayarak yapar. Matematiksel olarak ifade edilirse;¹⁴³

$$\hat{\beta} = \arg \min_{\beta \in R^p} \|Y - X\beta\|_2 + \lambda \sum_{k=1}^p |\beta_k| \quad (2.3)$$

Eşitlik 2.3 Lagrange ikiliği ile düzenlenirse;

$$\hat{\beta} = \arg \min_{\beta \in R^p} \|Y - X\beta\|_2^2 \quad (2.4)$$

$$\|\beta\|_1 \leq \theta \quad (2.5)$$

şeklini alır. $\lambda \geq 0$, parametre seçimini kontrol eden ve büzülme derecesini ayarlayan bir ayar parametresidir. λ çok büyük bir değer aldığıında, ℓ_1 norm kısıtlamasının doğası nedeniyle, tüm parametrelerin sıfırlanarak küçültüleceği, bunun da boş bir β vektörüne neden olacağını öngörür. Başka bir deyişle, λ 'ın büyüklüğü arttıkça, β 'daki elemanlar sıfıra doğru küçülür (Eşitlik 2.4). Eşitlik (2.9) 'daki 1 norm sınırlaması, λ ayar parametresinin bire bir karşılık gelen bir ceza parametresidir. Daralma işlemi sonrasında sıfıra eşit olan regresyon katsayısı değişkenleri modelden çıkarılır. Sıfır olmayan regresyon katsayılarına sahip değişkenler, yanıt değişkeniyle en fazla ilişkili olan değişkenlerdir. Açıklayıcı değişkenler ya niceliksel, kategorik ya da her ikisi birden olabilir.¹⁴⁴

2.5.7. Hiyerarşik Kümeleme Analizi

Veri seti üzerinde uygulanabilecek bir diğer sınıflandırma olan kümeleme analizleri veri setindeki örneklerin aralarındaki benzerliklere göre gruplara ayrıldığı istatistiksel yöntemdir. Kümeleme analizleri ile özellikleri bilinmeyen bir veri seti istenilen sayıda gruba ayrılabilirdiği gibi, bilinen gruplara ait örnekler için veri setindeki değişkenlerin gruplar üzerindeki etkisi test edilebilir. Kümeleme analizleri hiyerarşik ve hiyerarşik olmayan yöntemler olmak üzere iki ana gruptan oluşmaktadır. Hiyerarşik kümeleme yönteminde bileşenler birbirlerine en benzer olanlardan başlayarak oluşturulan grupların daha az benzerlik gösterilen daha büyük gruplar altında toplanarak kümelenmesi esasına

dayanır. Hiyerarşik olmayan yöntemlerde ise benzerlikler genel olarak değerlendirilerek bir kesim ekseni üzerinden birbirlerinden ayrılırlar.¹⁴⁵

Hiyerarşik kümeleme yönteminde anlatılan işlemlere dayalı olarak kullanılan hiyerarşik metotlardan en çok kullanılanları; Tek bağlantılı (*single*), tam bağlantılı (*complete*) ve ortalama (*average*) bağlantı yöntemleridir.

Tam bağlantıda, iki küme arasındaki mesafeyi, ilk kümedeki herhangi bir tek veri noktası ile ikinci kümedeki herhangi bir tek veri noktası arasındaki maksimum uzaklık tanımlanır. Arından kümeler işlemin her aşamasında en küçük komple bağlantı mesafesine sahip iki kümeyi birleştirilerek veri seti iki ana küme altında toplanır. Matematiksel olarak formülize edilirse;

$$d_{1,2} = \max_{i,j} d(X_i, Y_j) \quad (2.6)$$

şeklinde ifade edilir. Burada X ve Y iki farklı alt kümeye ait gözlem vektörlerini, $d_{1,2}$ gözlem vektörü X olan bir özne ile gözlem vektörü Y olan bir nesne arasındaki mesafeyi temsil eder.

Hiyerarşik kümeleme yönteminde özellikle işleyişin daha kolay anlaşılabilmesi için dendogramlardan (ağaç grafiği) yararlanılır. Dendrogramda örnekler arasındaki mesafeler örnekler arasındaki benzerlik ilişkilerini temsil ederler.¹⁴⁶

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kanserli hastalara ait tümörlü ve kontrol bölge FFPE örnekleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı FFPE doku arşivinden temin edildi. Kimyasal çözücü olarak kullanılan HPLC saflıkta ($\geq 99\%$) metanol, asetonitril, etanol, ksilen Sigma-Aldrich (Germany) firmasından temin edildi. Asetik Asit (CH_3COOH), DMSO, trifloro asetik asit (TFA) ve DL-ditiyotritol (DTT) Merck (Germany) firmasından, iyodoasetamit (IAA), 2-amino benzoik asit (2-AA), 2-pikolin boran, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum klorür (NaCl), trisodyum fosfat (Na_3PO_4), 4-nonilfenil-polietilen glikol (Tergitol, NP-40) ve 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOBt) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimit hidroklorür (EDC) Fluorochem (Hadfield, UK) firmasından, Peptit-N-glikozidaz F (PNGase F) enzimi Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) firmasından ve 2,5-dihidroksi benzoik asit (DHB) Bruker Daltonics (Bremen, Germany) firmasından alındı. Tüm çalışma boyunca deiyonize su günlük olarak ($R > 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$; PURELAB Ultra system; Elga Labwater, Ede, The Netherlands) sistemi ile hazırlanarak kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Örnek hazırlama işlemlerinde karıştırma ve inkübasyon amacıyla Thermomixer C (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), çözücü uzaklaştırma işlemleri için santrifüjlü vakum konsantratör (Eppendorf-Vacufuge Concentrator Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) cihazları kullanıldı. Ayrıca analitik hassas terazi (Mettler-Toledo, Balance MS204, USA), vortex-mixer (Eppendorf MixMate) ve santrifüj çalışma boyunca kullanılan diğer cihazlardır.

Kütle spektroskopisi ölçümlerinde 337 nm azot lazerine sahip bir Voyager-DE PRO MALDI-TOF-MS (Applied Biosystems, USA) cihazı ve kromatografik analizler için bir HPLC-FD (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, USA) sistemi kullanıldı.

3.2. FFPE Dokulardan N-Glikanların İzolasyonu

3.2.1. FFPE Dokulardan Parafinin Uzaklaştırılması ve Rehidrasyon

Meme kanseri hastalarına ait FFPE dokulardaki proteinlerin deglikozilasyonu işlemine doku yüzeyindeki parafinin uzaklaştırılması ile başlanmıştır. FFPE arşiv blokları mikrotom cihazında kesilerek 4 µm kalınlığında slaytlar elde edildi. Her biri 10 adet slayt içeren numunelerden parafinin etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmesi için numuneler 4 parçaya ayrılıp farklı eppendorf tüplere (1.5 mL'lik) alındı. Örnekler üzerine 1 mL ksilen ilave edilerek 1 dk. 300 rpm hızda vorteks ile karıştırıldı ve 5 dk 14000 rpm hızda santrifüj edildi. Ksilen fazı atıldıktan sonra çözücüyü tamamen uzaklaştırmak için örnekler santrifüjlü vakum konsantratörde (45 °C – 30 dk - su modunda) kurutuldu. Numunelerin rehidrasyonu için 1 mL etanol eklenerek vortex ile bir süspansiyon elde edilinceye kadar (yaklaşık 1 dk.) karıştırıldı ve tekrar 14000 rpm hızında santrifüj edildi. Etanol fazı numune üzerinden pipet yardımıyla atılarak santrifüjlü vakum konsantratörde (45 °C / 10 dk - alkol modunda) etanol tamamen uzaklaştırıldı.

3.2.2. Doku Numunelerinin Denaturasyonu ve Deglikozilasyonu

Denaturasyon için kullanılan denaturasyon tampon çözeltisi 0.4 M DTT çözeltisine %5 SDS eklenerek 5 mL olarak hazırlandı ve çalışma boyunca kullanıldı. Rehidrasyon işlemi tamamlanan numuneler üzerine dokuları tamamen kaplayacak miktarda su (20-30 µL) ve 25 µL denaturasyon tamponu eklendi. Çözelti vortex ile 300 rpm'de 30 sn karıştırıldı ve 97 °C'de 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından çözeltiler oda sıcaklığına gelene kadar beklendi. Numune üzerine 50 µL reaksiyon tamponu (0.5 M Na₃PO₄), 50 µL %10'luk NP-40 çözeltisi (500 µL NP-40 ve 4.5 mL su ile 5 mL hacimde hazırlanmıştır) ve 1 µL PNGase-F enzimi eklendi. Karışım 37 °C'de 150 rpm'de gece boyunca inkübe edildi.

Enzim ile deglikozilasyonu tamamlanan numuneler tekrar santrifüj edilerek (14000+ rpm'de 5 dk.) sıvı faz farklı bir tüpe alınarak etiketleme işlemleri ve analizler yapılabilmeye kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.3. N-Glikanların 2AA İle Etiketlenmesi

Deglikozilasyon sonrası elde edilen ve serbest halde glikanları içeren çözelti 2-AA reaktifi ile etiketlendi. 2-AA çözeltisi, 48 mg 2-AA'nın %15 asetik asit içeren 1 mL DMSO çözeltisi içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Bu çözeltinin 25 µL'si 50 µL numune üzerine ilave edildi. Ardından 25 µL 2-pikolin boran (107 mg/mL 2-pikolin boran içeren DMSO) çözeltisi bu karışımın üzerine eklendi. Etiketleme reaksiyonunun gerçekleşmesi için çözelti 65 °C'de 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 4'e ayrılan numuneler 2'şerli olarak birleştirildi. Çözelti oda sıcaklığına gelmesi beklenerek zenginleştirme işlemine hazır hale getirildi.

3.2.4. N-Glikanların Etil Esterifikasyon İle Etiketlenmesi

Bağlanma düzeyinde N-glikan yapılarını araştırmak üzere numuneler etil esterifikasyon reaksiyonuna maruz bırakılmıştır. Bu amaçla de glikozilasyon sonrası elde edilen numunelerden 2 µL alınarak üzerine 20 µL etilasyon reaktifi (0,25 M EDC ve 0,25 M HOBt içeren etanol çözeltisi) ilave edildi. Karışım 1 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra 20 µL ACN ilave edilerek 30 dk boyunca -20 °C'de bekletildi. Oda sıcaklığına gelmesi için bekletilen numuneler saflaştırma ve zenginleştirme işlemi için hazır duruma getirildi.

3.2.5. N-Glikanların Zenginleştirilmesi

Etiketlenmiş glikanları içeren numune çözeltilerinden glikanların zenginleştirilmesi hidrofilik bir zeminde ayrıştırma tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla kapasitesi 0.1-20 µL olan PLASTIBRAND pipet uçlarına 0.3 mg cam pamuğu bir enjektör ucu yardımıyla yerleştirildi. Cam pamuğunun pipet ucunun en uç kısmına gelecek şekilde herhangi bir açıklık olmaksızın çözücü yolunu kapatması sağlandı. Öncelikle pipet ucu (yükleme malzemesi) 10 µL deiyonize su ile 5 kez yıkandı. Ardından 10 µL %85'lik ACN çözeltisi ile 5 kez ykanarak şartlandırıldı. Yükleme çözeltisi etiketli glikanları içeren numune çözeltisinin 7 µL'si 28 µL ACN'e ilave edilerek hazırlandı. Şartlandırılmış pipet uçları ile yükleme çözeltisi 20 kez çekilip bırakılarak N-glikanların cam pamuğunu yüklenmesi sağlandı. Yükleme tamamlandıktan sonra cam pamuğuna yüklenen safsızlıkları uzaklaştırmak için pipet ucu önce %1 TFA içeren %85'lik ACN çözeltisinin 10 µL'si ile 5 kez yıkandı. Ardından 10 µL %85 ACN çözeltisi ile 5 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından etiketli N-glikanları elüe etmek için 10 µL deiyonize su yükleme malzemesini içeren pipet ucu ile 20 kez çekilip bırakıldı. Hazırlanan çözeltiler analiz edilinceye dek -20 °C'de saklandı.

3.3. N-Glikanların MALDI-TOF-MS Analizleri

3.3.1. MALDI-TOF-MS Yöntemi için Numune Hazırlama İşlemi

Saflaştırılmış N-glikanları içeren numunelerin 1 µL'si MALDI tabakasının üzerine direkt olarak eklendi ve kuruması için bekletildi. Matriks olarak kullanılan sDHP (2-hidroksi-5-metoksi-benzoik asit/DHB, 1:9, h/h) çözeltisinden 1 µL örneğin üzerine ilave edildi. Kristallenme tamamlanana kadar oda sıcaklığında bekletildi.

3.3.2. MALDI-TOF-MS Yöntemi için Spektroskopik Koşullar

Etiketli N-glikanların analizi 337 nm azot lazerine sahip bir Voyager-DE PRO MALDI-TOF-MS (Applied Biosystems, USA) sistemi ile geciktirmeli ekstraksiyon moduna yapıldı. Tüm spektrumlar negatif, lineer modda (kütle aralığı 1000-4000 Da) ve 20 kV hızlandırma potansiyeli uygulanarak elde edildi. Kristallendirilmiş örnekler üzerine 2000 Hz. frekans gücüne sahip lazerle 500 lazer atışıyla analizler gerçekleştirildi.

3.3.3. MALDI-TOF-MS Yöntemi Sonuçlarının Sayısal Verilere

Dönüştürülmesi

MALDI-TOF-MS analizi sonucu elde edilen spektrumlar Voyager Data Explorer yazılımı ile değerlendirildi. Yazılımda spektrumların ilgili m/z aralığı içindeki her bir noktaya ait intensite değerini sayısal bir değer olarak Microsoft Office Excel dosyası haline getirilmiştir. Etiketli N-glikan yapılarının moleküler ağırlıkları literatür bilgisinde faydalanarak belirlenmiştir. Bu kapsamda 49 adet farklı dallanmalara sahip N-glikan yapılarına ait moleküler ağırlıklar belirlendi. Moleküler kütlelerde sapma değeri ± 3 Da kabul edilerek N-glikanlara ait intensite değerleri belirlendi. Her spektrumda bulunan N-glikanların toplam bollukları 100 kabul edilerek her bir N-glikan için yüzde bağıl bolluk hesaplandı.

Bağıl bollukları belirlenen toplam 49 adet N-glikan için benzer kimyasal özelliklere sahip oldukları 23 farklı gruba göre toplam intensiteleri EK 1-F'de verilen hesaplama yöntemiyle belirlendi.

3.4. N-Glikanların HILIC-FD Analizleri

3.4.1. HILIC-FD Yöntemi için Kromatografik Koşullar

Daha önce 2-AA ile etiketlemiş olan N-glikan numuneleri floresans detektöre sahip HILIC kolon ve HPLC sistemi ile analiz edilmiştir. Analizde 150 x 4.6 mm

boyutlarında ve partikül çapı 5 µm partikül çapına sahip bir HILIC (hidrofilik etkileşimli HPLC) kolonu (TSKgel Amide 80) 30 °C kolon sıcaklığında kullanıldı. Çalışmada hareketli faz olarak iki çözelti karışımı (Çözelti A ve B) kullanıldı. Çözelti A, 50 mM formik asit çözeltisinin amonyum çözeltisi ile pH 4.4 değerine ayarlandığı çözelti idi. B çözeltisi olarak asetonytril kullanıldı. Çalışma boyunca kullanılan floresans dedektör için eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 330 ve 420 nm olarak belirlendi.

Gradient elüsyona hareketli faz bileşimi Çözelti A/B bileşimi 30/70 olarak başlandı, ardından 45 dk'da çözelti A bileşimi %50 olana dek kademeli olarak arttırıldı. Bunu takip eden 5 dk. içerisinde çözelti A bileşimi %100'e çıkarıldı. Daha sonra tekrar %30 3 dk. içerisinde düşürüldü ve 7 dk boyunca sabit tutuldu. Böylece her bir enjeksiyon 60 dk tamamlandı.

HILIC-Floresans yöntemler ile N-glikanlar için daha önce yapılmış çalışmaların yanı sıra N-glikan sıralamasının belirlenmesi amacıyla HPLC-Floresans detektörde yapılan ölçüm sırasında alınan her sinyalde sonra detektörden çıkan hareketli faz atıkları farklı tüplerde toplandı. 2 örnekte toplanan 25 ve 28 farklı fraksiyon konsantratörde kurutularak tekrar asetonytril içerisinde çözülüp MALDI-TOF-MS cihazında tekrar ölçüldü. Bu sayede herbir N-glikanın alıkonma zamanları tespit edildi.

3.4.2. HPLC-FD Yöntemi Veri Analizi

Kanserli ve kontrol numunelerinde aynı alıkonma zamanına karşılık gelen pikler ilgili N-glikana ait pik olarak kabul edildi ve pik alanı değerleri hesaplandı. Doku üzerinde tespit edilen tüm N-glikanların toplam pik alanı 100 kabul edilerek her bir N-glikan için bağıl bolluk değeri yüzde cinsinden hesaplandı. Kanserli ve kontrol dokularında farklılık gösteren N-glikanlar istatistiksel olarak belirlendi. Sonuçlar MALDI-TOF-MS analizi ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı.

3.5. Çalışmada kullanılan Doku Örneklerine Ait Bilgiler

Doku örnekleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda İnvaziv Duktal Karsinom şüphesi ile gelen meme dokusu biyopsi örnekleri arasından seçildi. Formalinle sabitlenerek parafine gömülü hale getirilen doku örneklerinden İDK tanısı alan 25 hastaya ait örnekler kullanıldı (Tablo 3.1). Kontrol numuneleri olarak hasta grubuna ait farklı tümör bölgelerinden alınmış olan ve immunohistokimyasal testler sonucu İDK tanısı almayan 11 adet FFPE doku örneği kullanıldı. Örnek grubu yaşları 33 ile 74 arasında değişen ve tamamı kadın olan hastalara aitti. Örnekler numune hazırlama işlemlerine kadar mikrosantrifüj tüplerde +4 °C'de saklandı.

Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde öncelikle İDK tanısı alan 25 hastaya ile 11 kontrol dokusu istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bir diğer karşılaştırma hastalığın ilerleyişini belirten "Nükleer grade" seviyeleri kullanılarak ileri derece, orta derece ve kontrol (NG 3, NG2 ve kontrol) örnekleri arasında N-glikan yapıları bakımından bir farklılık olup olmadığı araştırıldı.

3.6. İstatistiksel Veri Analizleri

N-glikan ölçümlerine ait tüm veri analizleri RStudio istatistiksel yazılım programı (versiyon 1.0.136, RStudio,Inc.) ile gerçekleştirildi. t-testi ("t.test" fonksiyonu) ve *Kruskal-Wallis* ("kruskal.test" fonksiyonu) ile, korelasyon ilişkilerini incelemek amacıyla *Spearman* sıra korelasyon testi ("cor" fonksiyonu)¹⁴⁷, ROC analizleri "ROCR"¹⁴⁸, hiyerarşik kümeleme analizleri "hclust" ve "vegan"¹⁴⁹ paketleri ile uygulandı.

Veri setine herhangi bir dönüşüm uygulanmadı ve istatistiksel analizler yüzde bağıl değerler üzerinden gerçekleştirildi. Grafiklerin hazırlanmasında yine R yazılım kütüphanesinden "ggplot2"¹⁵⁰ paketi kullanılmıştır. İstatistiksel sonuçlar analiz çıktıları üzerinden yorumlanmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan ve İDK tanısı almış 25 hastaya ait patoloji rapor bilgileri

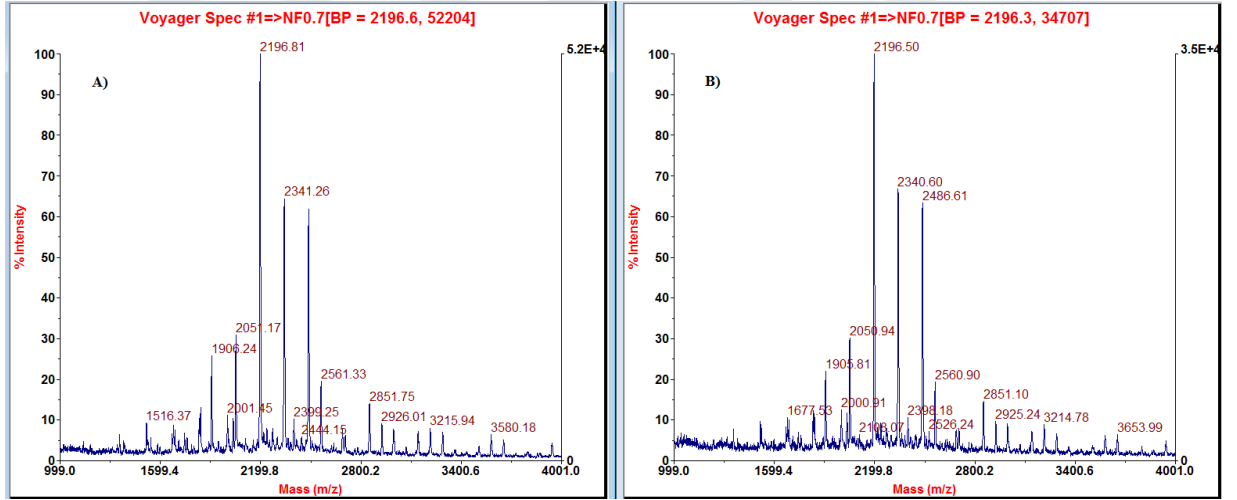
Örnek No	Hasta	Yaş	Tanı	Nükleer Grade	Histolojik Grade	Rapor Tarihi
N-1	CP	43	İDK	2	2	Temmuz/2015
N-2	MB	35	İDK	2	2	Şubat/2015
N-3	RY	50	İDK	2	2	Aralık/2014
N-4	ŞA	67	İDK	3	3	Aralık/2014
N-5	RÇ	44	İDK	2	2	Mayıs/2015
N-6	AT	55	İDK	2	2	Mayıs/2015
N-7	NP	39	İDK	2	2	Nisan/2015
N-8	MŞ	58	İDK	3	3	Mayıs/2015
N-9	NB	53	İDK	2	2	Mayıs/2015
N-10	NP	35	İDK	3	3	Ocak/2016
N-11	PS	68	İDK	2	2	Aralık/2014
N-12	BŞ	55	İDK	2	2	Temmuz/2015
N-13	NA	41	İDK	2	2	Temmuz/2015
N-14	ZY	74	İDK	2	2	Haziran/2015
N-15	ZH	53	İDK	2	2	Mart/2015
N-16	SB	47	İDK	2	2	Nisan/2015
N-17	SY	41	İDK	2	2	Ocak/2015
N-18	NG	55	İDK	3	2	Ocak/2015
N-19	Eİ	50	İDL	2	2	Şubat/2015
N-20	ES	33	İDK	2	2	Ocak/2015
N-21	RC	66	İDK	3	2	Aralık/2014
N-22	NK	51	İDK	2	2	Mayıs/2015
N-23	FA	47	İDK	3	3	Haziran/2015
N-24	FD	44	İDK	2	2	Mart/ 2015
N-25	AB	40	İDK	2	2	Nisan/2015

4. BULGULAR

4.1. MALDI-TOF-MS Analizlerinde Zenginleştirme Çalışmalarının

Karakterizasyonu

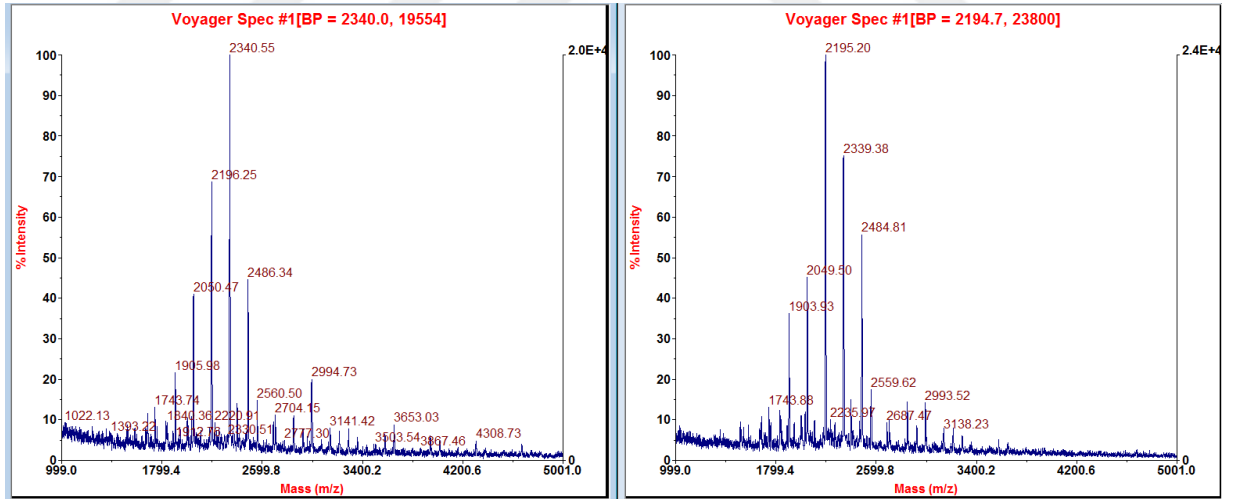
N-bağlı glikoprotein yapılarının biyolojik numunelerdeki miktarlarının diğer biyomoleküllere oranla daha düşük olması analiz edilmelerini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda numunelerden enzimatik parçalama yoluyla ile ayrılarak izole edilen glikoprotein yapıları için zenginleştirme çalışması uygulanmıştır. Bölüm 3.2’de anlatıldığı üzere hazır halde bulunan ticari pipet ucu filtreler ile laboratuvarında hazırlanan cam pamuğu içerikli pipet ucu filtrelerde zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiş ve sonuçta verimliliğin birbirine yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Çalışmaya cam pamuğu ile hazırlanan pipet ucu filtrelerde devam edildi.



Şekil 4.1. Farklı zenginleştirme materyalleri ile elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları A) Ziptip filtre ile zenginleştirilen numuneye ait spektrum B) Cam pamuğu filtre ucu ile zenginleştirilen numuneye ait spektrum

Formalinle sabitlenmiş parafinli 4 μ L kalınlığındaki doku slaytlarında örneğin alındığı bölgenin çapına bağlı olarak değişik miktarlarda doku kesiti bulunması nedeniyle ölçüm sonuçları yüzde bağıl miktarlar üzerinden değerlendirilmiştir.

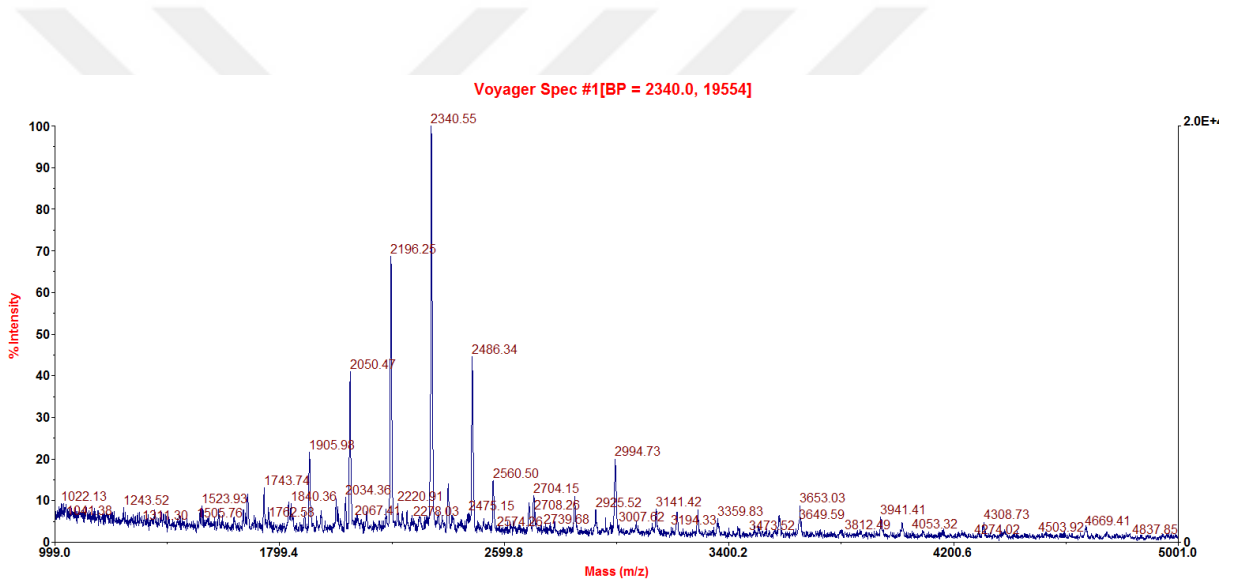
Doku numunelerinin analize hazırlanması işlemi parafinden uzaklaştırılma, denatürasyon, enzimatik parçalama, saflaştırma ve zenginleştirme gibi birçok adım içermektedir. Bu aşamalar sırasında meydana gelecek bir hata numune içeriğinin yanlış analiz edilmesine yol açabilir. Bu nedenle numune hazırlama aşamasında toplam 12 slayttan oluşan her bir doku örneği 6'şar slayttan oluşan 2 gruba ayrılarak çalışıldı. Ölçümler sonucunda hatalı (gürültünün yüksek olduğu ya da N-glikan yapılarının olmadığı) örnekler çıkarılmış, en çok N-glikan sinyalinin tespit edildiği spektrumlar seçildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Meme kanseri tanısı almış bir hasta numunesinin 2 farklı grubuna ait MALDI-TOF-MS spektrumları

4.2. N-bağlı Glikan Yapıların Etiketlenme Verimliliği

Glikoprotein yapısından ayrılan N-glikanların kütle spektroskopisinde iyonizasyon veriminin artırılması ve HPLC-HILIC-FL yöntemi ile analizinde yapıya floresan özellik kazandırma amacıyla etiketleme olarak tanımlanan türevlendirme reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla N-glikanlar için sıklıkla kullanılan 2-AA ve etil esterifikasyon etiketleme yöntemleri aynı numuneler üzerinde denendi. 2-AA etiketleme ile elde edilen örneklerde N-glikan yapılarının çok daha yüksek bir verimle elde edildiği gözlemlendi (Şekil 4.3) ve çalışmanın devamında bu yöntem kullanıldı.

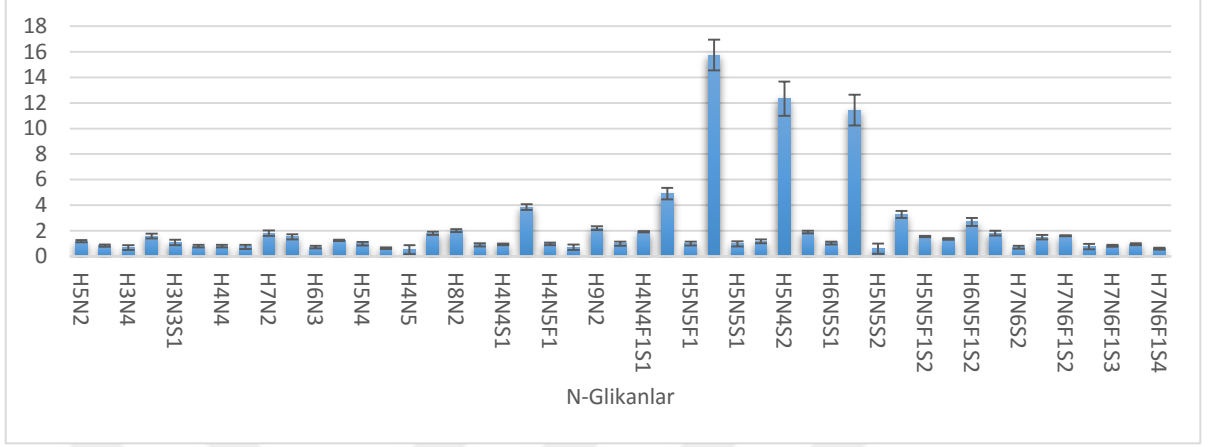


Şekil 4.3. 2-AA ile etiketlenen bir hasta doku örneğine ait MALDI-TOF-MS spektrumu

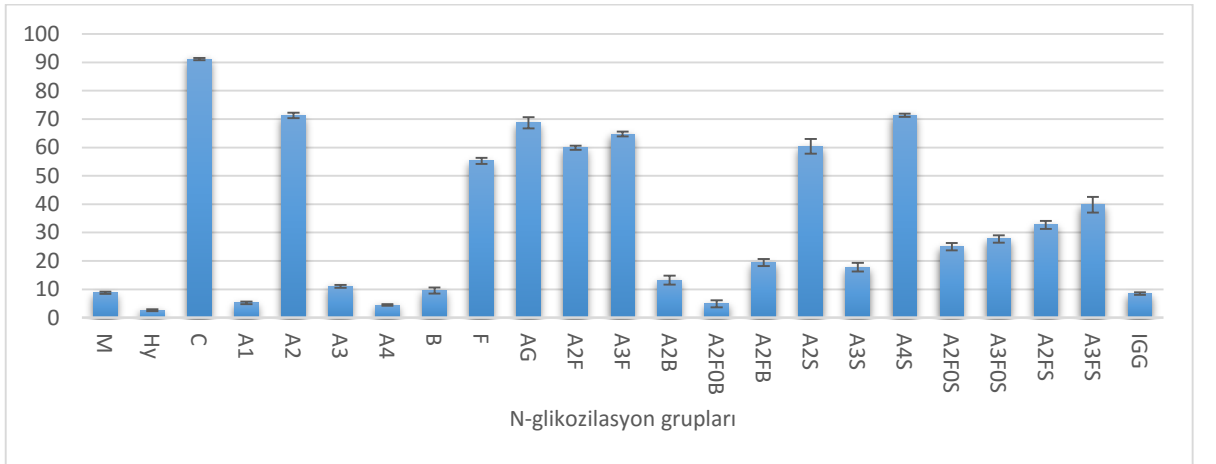
4.3. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğini hesaplamak amacıyla kanserli doku örneklerinden birisine ait etiketli N-glikan çözeltisinin 4 farklı ölçümü ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Spektrumlarda görülen her bir N-glikan yapısı ve N-glikozilasyon grupları için ortalama değerler hesaplandı. N-glikanlar ve N-glikozilasyon grupları için standart sapma değerleri belirlendi. Sonuçlar ölçüm sonuçlarının standart sapmalarının

N-glikan yapıları için 1.34 ve N-glikozilasyon grupları için 2.75'in altında olduğunu göstermektedir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.4. N2 nolu kanser dokusuna ait dört farklı ölçüm sonucu elde edilen N-glikan değerlerin ortalamaları



Şekil 4.5. N2 nolu kanser dokusuna ait dört farklı ölçüm sonucu elde edilen N-glikozilasyon gruplarına ait değerlerin ortalamaları

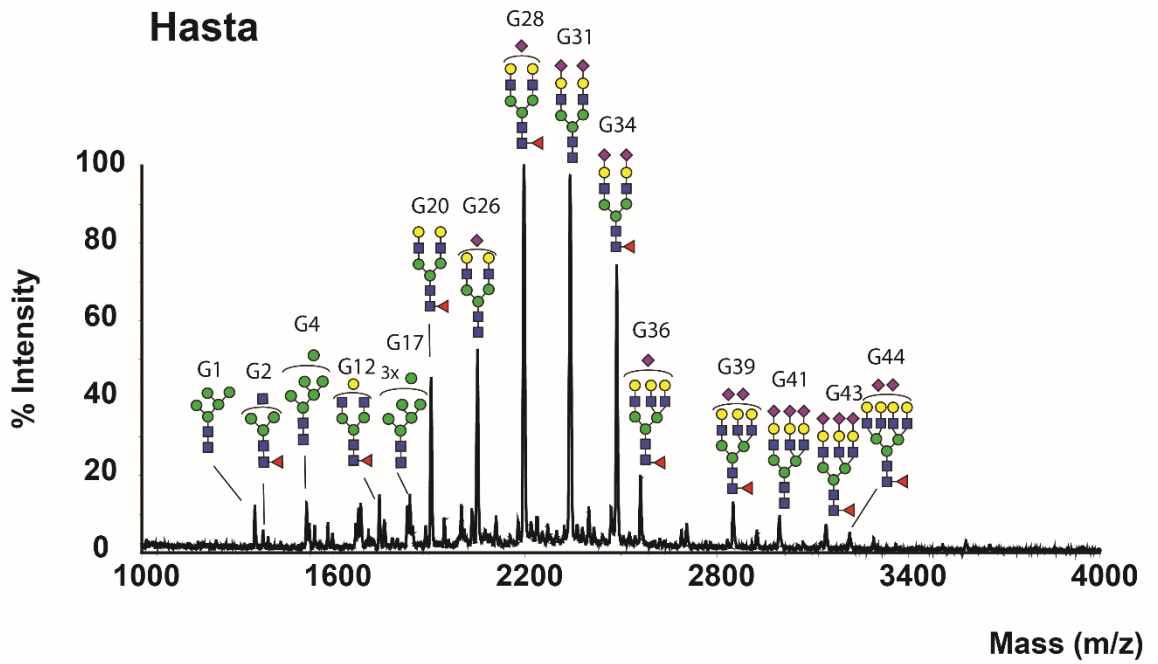
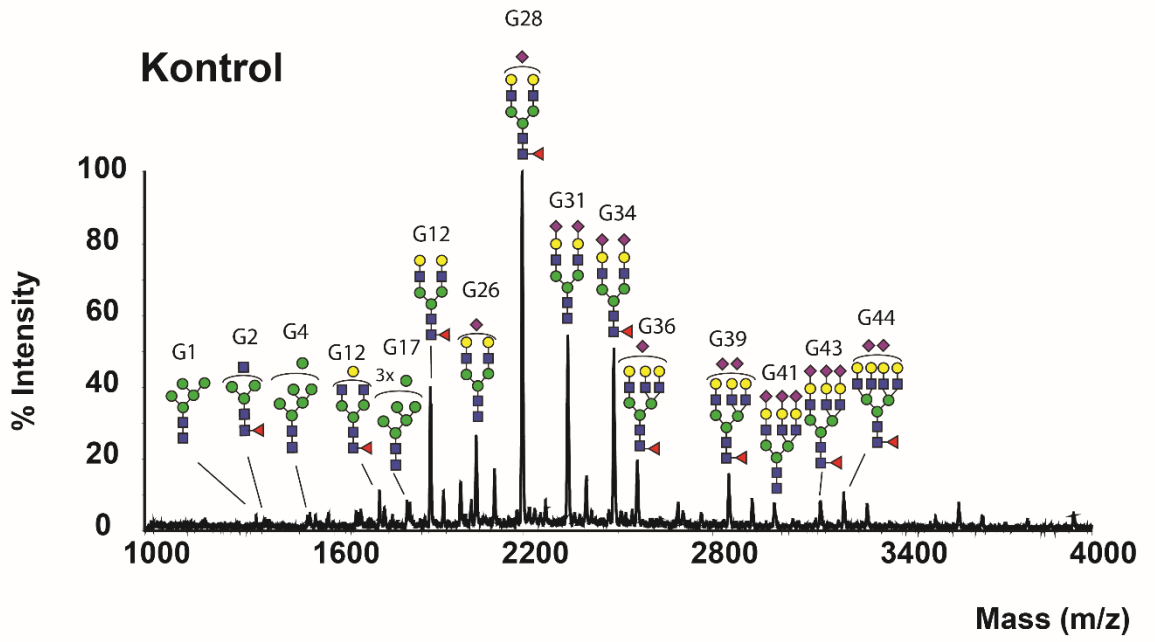
4.4. MALDI-TOF-MS Spektrumlarından N-Bağlı Glikanlar ve Glikan

Gruplarının Belirlenmesi

Örnek analizlerinden elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları Vayger Data Explorer yazılımı kullanılarak sayısal verilere dönüştürüldü. N-glikan bileşenleri 0.3 Da kütle doğruluğunda GlycoWorkbench 2.1 stable build 140 (European Carbohydrates DataBase project; <http://www.eurocarbdb.org/>) yazılımı ve literatürdeki bilgilerden faydalanılarak tespit edildi (EK 1-A).

İnsan proteinlerinde en yoğun şekilde bulunan ve kütleleri 1000-4000 kDa aralığındaki toplam 47 adet N-glikan ilgili spektrumlar üzerinde belirlendi(Şekil 4.6). Ayrıca bu N-glikanlar çeşitli kimyasal özelliklerine göre Tablo 4.1’de gösterilen 23 farklı grup içerisinde toplandılar. MALDI-TOF-MS analizi ile elde edilen spektrumlar Bölüm 3.3.3’te anlatıldığı gibi sayısal verilere dönüştürüldü. Her bir N-glikan yapısına ait m/z oranları ± 3 toleransla tespit edildi ve bu aralık içerisindeki en yüksek intensite değeri kaydedildi. Toplam intensite 100 kabul edilerek her bir N-glikan için bağıl intensite değerleri hesaplandı. N-Glikan yapılarını içeren toplam 23 adet N-glikan grubu için bağıl intensite değerleri Ek 1-F’de gösterildiği gibi hesaplandı.

MALDI-TOF-MS spektrumları üzerinde N-glikan yapılarının tespiti boyunca hem kanserli hemde kontrol dokularında tespit edilebilecek boyutta olan pikler (sinyal/gürültü oranı=1/3) seçildi, diğer N-glikanlar çalışmadan çıkarıldı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MALDI-TOF-MS yöntemiyle FFPE doku örneklerinden elde edilen ve N-glikan yapıları belirlenen bir kontrol ve bir hastaya ait kütle spektrumları

Tablo 4.1. Benzer kimyasal özelliğe sahip N-glikanlardan oluşan gruplar

N-Glikozilasyon Grubu	Simge	Özellik
GG1	M	Oligomannozik glikanlar
GG2	Hy	Hibrit glikanlar
GG3	C	Kompleks glikanlar
GG4	A1	Tek antenli glikanlar
GG5	A2	İki antenli glikanlar
GG6	A3	Üç antenli glikanlar
GG7	A4	Dört antenli glikanlar
GG8	B	Simetrik glikanlar
GG9	F	Fukozlanmış glikanlar
GG10	AG	Anten üzerinden galaktozilasyonu olan glikanlar
GG11	A2F	İki antenli yapı üzerinden fukozlanmış glikanlar
GG12	A3F	Üç antenli yapı üzerinden fukozlanmış glikanlar
GG13	A2B	Simetrik iki antenli glikanlar
GG14	A2F0B	Simetrik iki antenli fukozlanmamış glikanlar
GG15	A2FB	Simetrik iki antenli fukozlanmış glikanlar
GG16	A2S	İki antenli siyalilasyona uğramış glikanlar
GG17	A3S	Üç antenli siyalilasyona uğramış glikanlar
GG18	A4S	Dört antenli siyalilasyona uğramış glikanlar
GG19	A2F0S	Siyalilasyona uğramış fukozlanma içermeyen iki antenli glikanlar
GG20	A3F0S	Siyalilasyona uğramış fukozlanma içermeyen üç antenli glikanlar
GG21	A2FS	Siyalilasyona uğramış ve fukozlanmış iki antenli glikanlar
GG22	A3FS	Siyalilasyona uğramış ve fukozlanmış üç antenli glikanlar
GG23	IGG	IgG'ye özgü glikan yapıları

4.5. MALDI-TOF-MS Sonuçlarının İstatistiksel Analizleri

4.5.1. İstatistiksel Olarak Anlamli Farklılıkların Belirlenmesi

Verilerin incelenmesinde ilk adım olarak kanser-kontrol ve nükleer grade (NG) seviyeleri-kontrol ölçümleri arasında farklılık gösteren N-glikanların ve N-glikan gruplarının toplam veri kümesinden ayrılması amaçlanmıştır.

t-testi istatistiksel sonuçları Ek 1-B'de verilmiştir. t-testi sonuçları 16 N-glikanın $p < 0.001$ seviyesinde ve 19 N-glikanın $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda farklılık değerinin $p < 0.001$ (maksimum hata $< 1/1000$) seviyesinde olduğu N-glikan yapıları incelendi (Tablo 4.2).

Kanser durumunun bir fonksiyonu olarak N-glikan miktarları üzerine oluşturulan bu modelde her bir glikan için hastalık durumuna göre ortalama değerler, karşılaştırılan gruplar arasındaki varyans, anlamlılığın bir göstergesi olarak serbestlik derecesi, standart hata ve p-değerleri verilmiştir. N-glikan grupları için yapılan t-testi sonuçları 6 grubun $p < 0.001$ seviyesinde (Tablo 4.3) ve 9 grubun $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır (Ek 1-B).

Farklı kanser evrelerindeki hastaların N-glikan profilleri arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla 25 adet kanserli numuneye ait nükleer grade seviyeleri üzerinden karşılaştırma bir non-parametrik analiz yöntemi olan Kruskal-Wallis testi ile gerçekleştirildi. Test sonuçları Kruskal-Wallis ki-kare oranı, serbestlik derecesi ve p değerleri olarak Ek 1-C'de verilmiştir. Test sonuçları $p < 0.001$ seviyesinde anlamlı farklılığın olmadığını, $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı farklılığın ise 2 N-glikan yapısında ve 2 N-glikan grubunda mevcut olduğunu göstermektedir (Tablo 4.4).

Tablo 4.2. Kanserli-kontrol grupları arasındat-testi sonucu anlamlı farklılık gösteren N-glikanlar (p<0.001)

	Ortalama (Kontrol-Kanser)		t değeri	Serbestlik Derecesi F(1.34)	p-değeri
G1	0.939	2.228	-5.824	33.99	<0.001
G2	0.720	1.159	-4.069	28.06	<0.001
G4	1.129	2.397	-6.421	32.49	<0.001
G6	1.034	2.314	-4.489	26.96	<0.001
G9	1.056	1.923	-7.111	33.80	<0.001
G10	1.839	1.258	5.798	23.62	<0.001
G12	1.873	2.691	-4.038	30.09	<0.001
G16	1.521	2.260	-5.197	33.84	<0.001
G23	3.103	1.643	5.309	11.62	<0.001
G27	3.893	1.879	4.140	12.37	<0.001
G32	3.229	1.818	5.851	11.82	<0.001
G35	0.972	0.651	6.953	27.17	<0.001
G36	3.376	2.219	4.738	27.60	<0.001
G37	1.335	0.886	4.561	31.64	<0.001
G39	2.419	1.515	4.086	25.52	<0.001
G43	1.423	0.775	4.266	20.32	<0.001

Tablo 4.3. Kanserli-kontrol grupları arasında t-testi analizi sonucu anlamlı farklılık gösteren N-Glikan grupları (p<0.001)

	Ortalama (Kontrol-Kanser)		t değeri	Serbestlik Derecesi F(1.34)	p-değeri
GG4	4.125	6.276	-7.609	28.10	<0.001
GG5	73.780	79.940	-6.302	32.92	<0.001
GG6	1.911	4.807	4.777	25.11	<0.001
GG10	3.197	8.111	4.747	24.18	<0.001
GG13	15.359	20.834	3.863	16.51	<0.001
GG15	20.099	16.733	4.123	19.44	<0.001

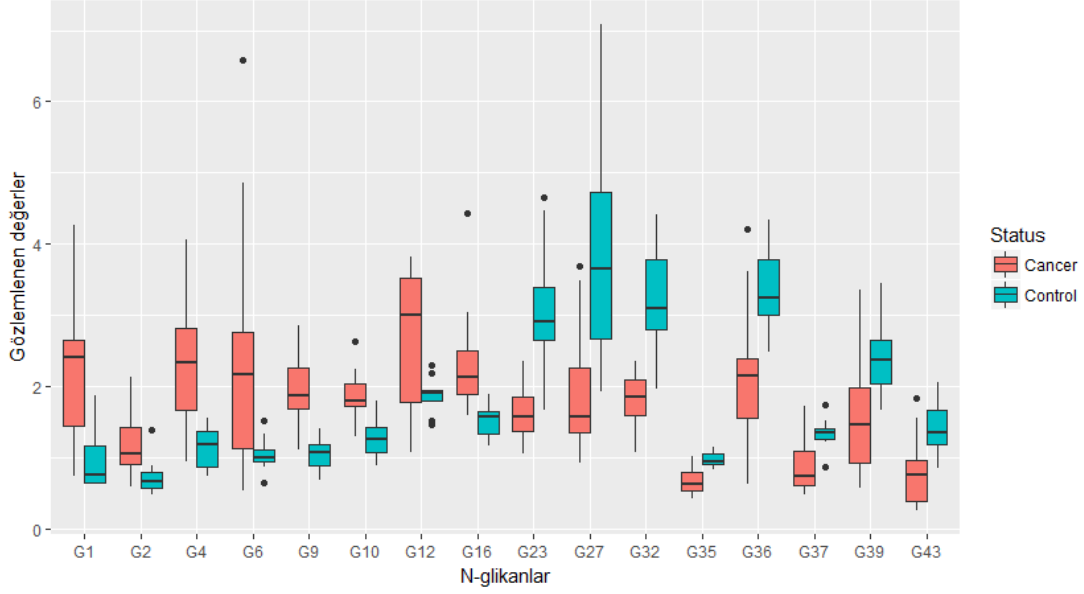
Tablo 4.4. Kanserli-kontrol grupları arasında Kruskal-Wallis testi sonucu anlamlı farklılık gösteren N-glikanlar ve N-glikan grupları

	W değeri	p-değeri
N-glikan		
G19	25	0.0427
G26	19	0.0139
N-glikozilasyon grubu		
GG9	96	0.0112
GG11	93	0.0207

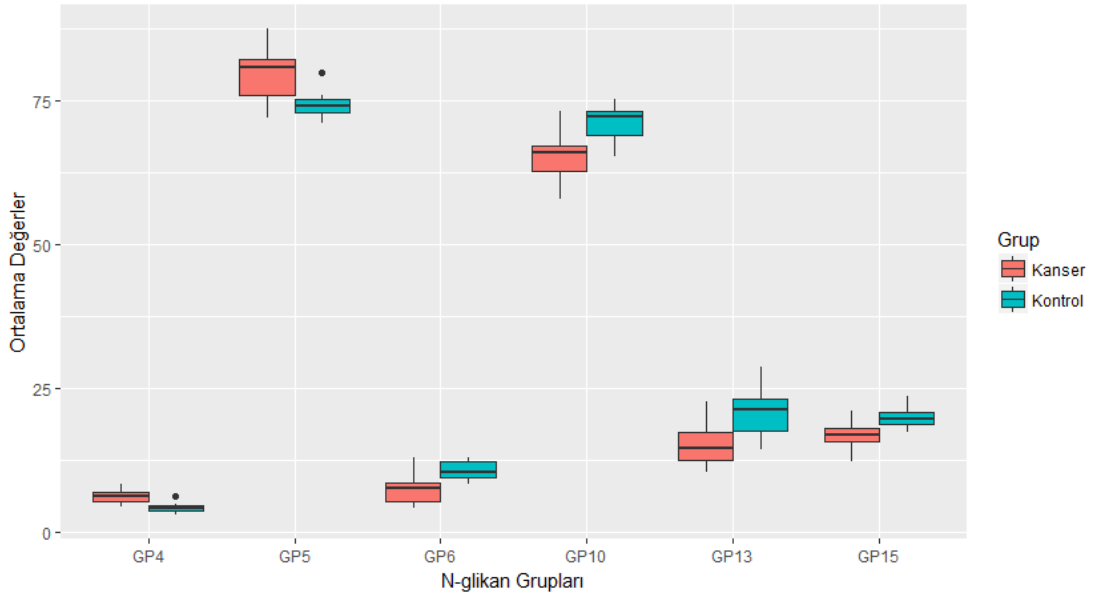
Anlamlı farklılık test sonuçları p-değerleri 0.05'ten küçük ve 0.001'den küçük olmak üzere iki farklı anlamlılık kategorisi üzerinden değerlendirildi. Ek 1-B'de N-glikanlar için oluşturulan modelde toplamda 33 N-glikan yapısında kanserli ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık tespit edildi. Kanserli hastalarda NG seviyelerinin dâhil edilmesiyle oluşturulan gruplarda ise 2 adet N-glikan yapısında ve 2 N-glikan grubu değerlerinde anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir. Ek 1-C'de N-glikan grupları için yapılan t-testi sonuçları 23 adet gruptan 9 tanesinde bir farklılığın olduğunu göstermektedir. Bu gruplardan 6 tanesinde p-değeri <0.001 seviyesindeyken 4 tanesinde <0.05 seviyesindedir.

Şekil 4.7. ve Şekil 4.8'de sırasıyla N-glikanlar ve N-glikan gruplarının kanserli ve kontrol numunelerindeki miktarları kutu grafiklerle ifade edilmektedir. Grafiklerde ortalamaların her iki grupta farklı olduğu ancak dağılımlarının bazı noktalarda üst üste örtüştüğünü görülmektedir. p-değerleri üzerinden anlamlı farklılıklar elde edilse de kolerasyon katsayılarının düşük ve standart hataların yüksek oluşu verilerin iki grup arasında eşit olarak dağılmadığı ve yüksek bir varyans gösterdiğini ifade etmektedir. Sonuçlar kanser ve kontrol gruplarını kesin bir şekilde birbirinden ayırt edebilecek bir model için N-

glikanların birbiriyle etkileşimini inceleyen daha detaylı istatistiksel analizlere ihtiyaç olduğunu göstermektedir.



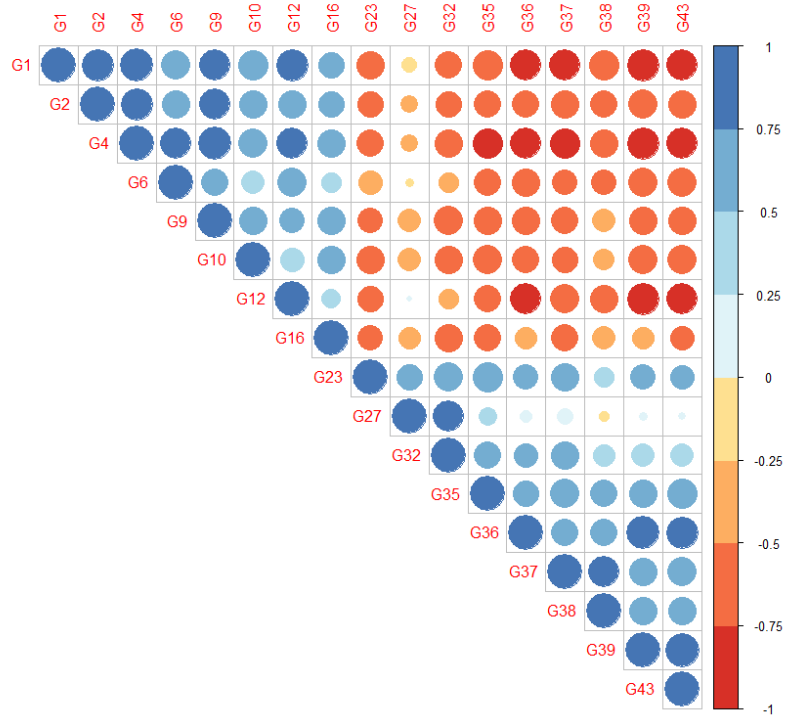
Şekil 4.7. Kanserli-kontrol grupları arasında $p < 0.001$ seviyesinde anlamlı farklılık gösteren N-glikan türlerine ait kutu grafikler



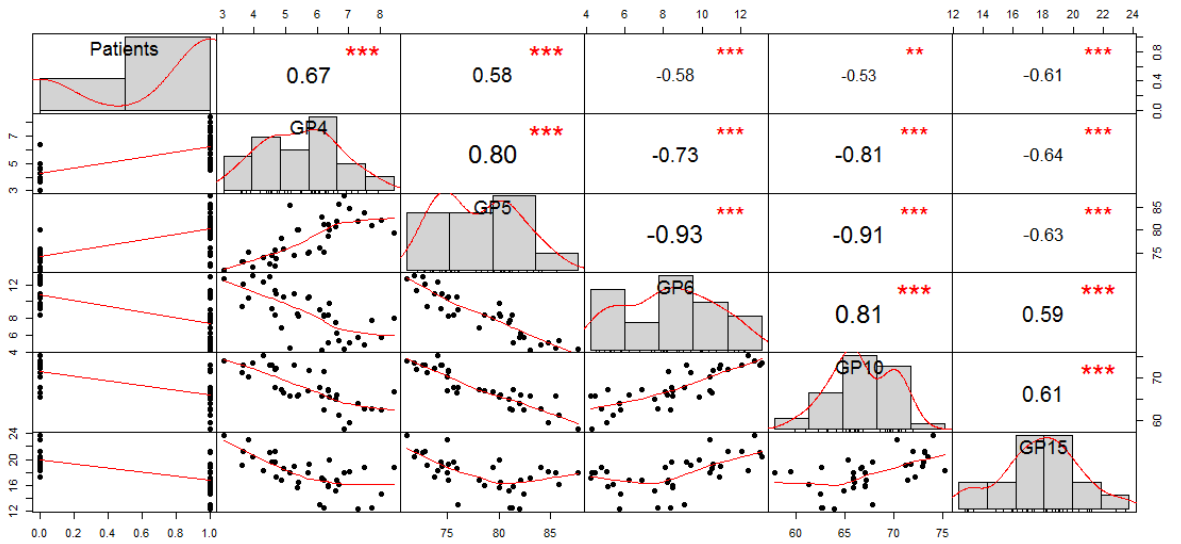
Şekil 4.8. Kanserli-kontrol grupları arasında $p < 0.001$ seviyesinde anlamlı farklılık gösteren N-glikan gruplarına ait kutu grafikler

4.5.2. N-glikanların Değişiminde Korelasyon (Bağıntı) İlişkisi

Potansiyel bağımsız değişkenler olarak N-glikanlar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak üzere modelimize çoklu korelasyon grafiği ile başlanmıştır. Korelasyon katsayılarının belirlenmesinde “Spearman” yöntemi uygulandı. Ek 1-D’de korelasyon test sonuçları değişkenlerin ikili ilişkilerini korelasyon katsayıları (r) cinsinden ifade edilmektedir. Şekil 4.9’da Spearman korelasyon grafiğinde birer değişken olarak N-glikan değerlerinin kendi aralarındaki korelasyon, r katsayısının 1 ile -1 arasında değişen değerleri için renk skalası ile ifade edilmiştir. N-glikanlar molekül ağırlıklarına göre en basit yapılı olandan başlayarak (G1) giderek artan bağ ve dallanma sayısı ile en kompleks yapıya doğru (G47) kodlandılar. Dolayısıyla Şekil 4.9’daki veriler basit yapılı N-glikanlar ile kompleks yapılı olanların kendi aralarında pozitif ama iki grup arasında negatif yönlü bir korelasyona sahip olduğunu göstermektedir. Diğer N-Glikan yapılarının ise kontrollerde kanserlere oranla daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. Benzer şekilde N-glikozilasyon gruplarının kanser-kontrol ölçeğinde değerlendirildiği Spearman korelasyon grafiği GP4 ve GP5 nolu gruplarda kanserli örneklerde bir artış gözlemlenirken GP6, GP10, GP13 ve GP15 nolu gruplarda kontrol örneklerinde birbirine benzer bir artış olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.10). N-glikozilasyon gruplarındaki değişimin r katsayıları bu değerlerin N-glikanlara benzer bir şekilde pozitif veya negatif ancak yüksek bir korelasyona sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. N-glikan ölçümlerinin kanser-kontrol gruplarındaki değişimlerini gösteren Spearman kolerasyon testi sonuçlarına ait ısı grafiği



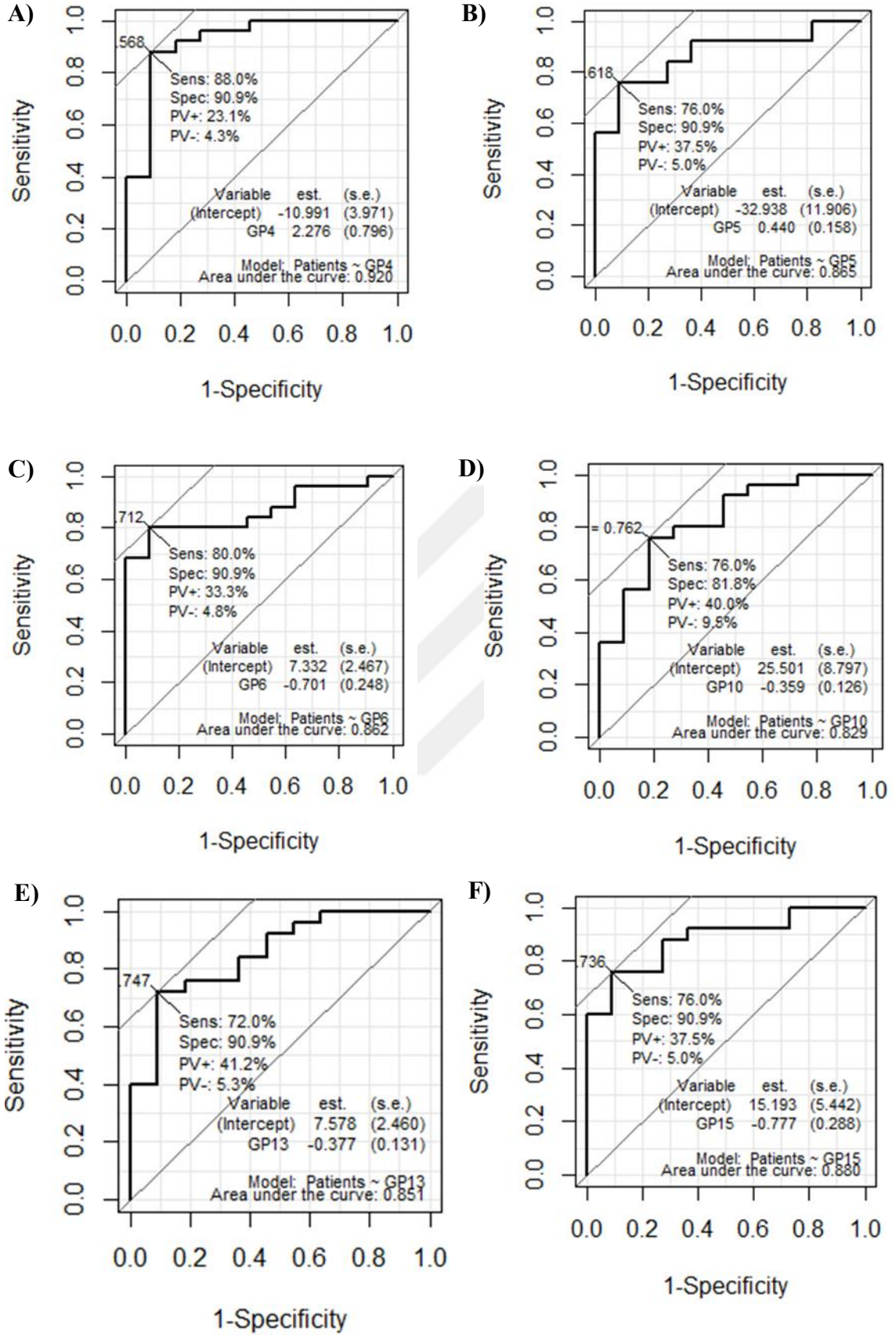
Şekil 4.10. N-glikan ölçümlerinin kanser-kontrol gruplarındaki değişimlerini gösteren Spearman Kolerasyon grafiği

4.5.3. N-glikozilasyon Gruplarının Yanıt Tahmin Yetenekleri (ROC Analizi)

Biyobelirteç çalışmalarında hastalık durumu bilinen numunelere karşı biyobelirteç adayının tahmin yeteneğini değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılan istatistiksel bir yöntem olan ROC (Alicı İşletim Karakteristiği) analizi anlamlı farklılık gösteren N-glikozilasyon gruplarına uygulandı. ROC analizinde N-glikozilasyon değeri birbiriyle karşılaştırılarak sınır değerler belirleyen, gerçekte (immunohistokimyasal tanıda) kanser olanlar ve olmayanlarla karşılaştıran parametrik bir algoritma kullanıldı. Analiz sonucu duyarlılık (doğru pozitif oran) ve özgünlük (doğru negatif oran) değerlerinin en yüksek olduğu değerde yer alan kesin noktası değerleri için pozitif ve negatif olabirlik oranları, sınıflandırmanın başarı ölçütü olarak eğrinin altında kalan alan (AUC) değerleri Tablo 4.5'te belirtilmiştir.

Tablo 4.5. N-glikozilasyon gruplarında ROC algoritmasının sınır değerler için kategoriler

	GG4	GG5	GG6	GG10	GG13	GG15
Duyarlılık (%)	%88.0	%76.0	80.0	76.0	72.0	76.0
Özgünlük (%)	%90.9	90.9	90.9	81.8	90.9	90.9
PV+ (%)	%23.1	37.5	33.3	40.0	41.2	37.5
PV- (%)	%4.3	5.0	4.6	9.5	5.3	5.0
Optimum Kesim Noktası	0.568	0.618	0.712	0.762	0.747	0.736
Standart hata	0.796	0.158	0.248	0.126	0.131	0.288
AUC	0.920	0.865	0.862	0.829	0.851	0.880



Şekil 4.11. N-glikozilasyon gruplarına ait ROC analiz eğrileri **a)** GG4 nolu grup **b)** GG5 nolu grup **c)** GG6 nolu grup **d)** GG10 nolu grup **e)** GG13 nolu grup **f)** GG15 nolu grup

Duyarlılık değerleri hastalığın seyrinde olan bireylerde hastalığın tespiti için yeterliliği, özgünlük ise testin koşullarını sağlamayan bireyleri dışlama yeteneğinin bir ölçüsü olarak verilmektedir. Dolayısıyla ROC eğrisi üzerinde hastalığın tespiti ve yanlış sonuçların dışlanma yeteneği arasında bir denge söz konusudur. Şekil 4.11'deki verilen ROC eğrilerinde optimum kesme noktalarının üzerinde yer alan ve sınır değere paralel olan çizgiler o kesme noktasına tam uyum gösteren veriler için geçerli olan tahmin değerlerini temsil etmektedir.

Pozitif ve negatif öngörü değerleri (PV+ ve PV-) hastalığın prevalansına bağlı olarak değişim gösteren değerler olarak tanımlanırlar ve hassasiyetle logaritmik bir şekilde değişim gösterirler.

4.5.5. Çoklu N-glikan Değerlerinin Temel Bileşen Analizleri (PCA)

N-glikan yapıları arasındaki yüksek korelasyon bu değişkenlerin veri seti üzerinde birbirlerine benzer etkiler göstermelerine ve veri setindeki farklılıkların tespitini engellemelerine neden olmuştur. N-glikan değerleri üzerinden kanser-kontrol örnekleri arasında tahminleme yapabilmek için gerekli farklılığı ortaya koyan değişkenleri belirlemek amacıyla veri seti üzerinde temel bileşen analizi (PCA) tekniği uygulandı. PCA ile;

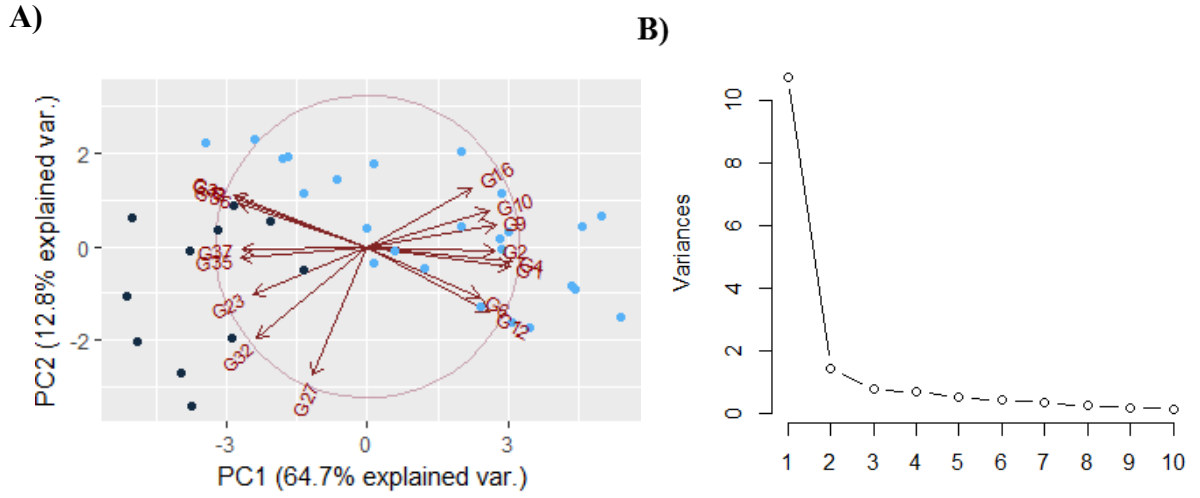
- Veri setinin boyutunu azaltmak ve daha küçük bir matris elde etmek,
- Veri seti üzerinde tahmin yapabilmek,
- Veri setini grafiklerle görünür hale getirmek amaçlanmıştır.

Analizde t testi sonucu anlamlı farklılıkların $p < 0.001$ seviyesinde olduğu N-glikan değerleri kullanılmıştır. Veri seti PCA analizinde ihtiyaç duyulan normal dağılıma sahip olduğundan veri seti üzerine herhangi bir dönüşüm (logaritmik vb.) uygulanmamıştır. PCA analiz sonuçları toplam 16 değişken için elde edilen 16 eksene ait standart sapma, varyans ve kümülatif oran değerleri Tablo 4.6'da sunuldu.

Tablo 4.6. 16 N-glikana ait değerleri için yapılan temel bileşen analizi sonucu elde edilen eksen gruplarına ait etki değerleri

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Standart Sapma	3.2168	1.4315	0.8421	0.8022	0.7334	0.6614	0.6101	0.5002
Varyans oranı	0.6468	0.1281	0.0443	0.0402	0.0336	0.0273	0.0233	0.0156
Kümülatif oran	0.6860	0.7748	0.8192	0.8594	0.8930	0.9204	0.9437	0.9593
	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16
Standart Sapma	0.4163	0.3640	0.3438	0.3081	0.2293	0.1835	0.1601	0.1348
Varyans oranı	0.0108	0.0082	0.0073	0.0059	0.0032	0.0021	0.0016	0.0011
Kümülatif oran	0.9702	0.9785	0.9858	0.9918	0.9951	0.9972	0.9988	1.0000

İlk iki eksenindeki toplam varyansın %77.1'ine denk geldiği ve ilk iki eksen dışında diğerlerinin veri seti üzerinde büyük bir etkisi olmadığı görölmektedir (Şekil 4.12-B). Ek 1-F'de verilen ve N-glikan değerlerinin herbir temel bileşen eksenindeki varyans değişimini gösteren kovaryans tablosunda ilk iki ekseninde en yüksek varyansı gösteren 10 değişkenin toplam varyansa katkısı birinci bileşende %58.70, ikinci bileşende ise % 89.38 olmuştur (Ek 1-F). İlk iki bileşendeki varyansın %90'ın altında olması modelin veri setini bütünüyle temsil etmediğini göstermektedir. İki boyutlu özdeğer grafiğindeki yönlendirmeleri incelendiğinde birbirine benzer etkiler gösteren ve yüksek korelasyona sahip değişkenlerin var olduğu görölmektedir (Şekil 4.12). PCA sonuçları benzer şekilde birinci ve ikinci özdeğer eksenlerinde yüksek bir varyansın olduğu, diğer boyutlarda bu etkinin ciddi bir şekilde azaldığı görölmektedir (Ek 1-F). Söz konusu sonuçlar tanı yeteneğine sahip bir model oluşmak amacıyla ilave bir boyut azaltma işleme ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

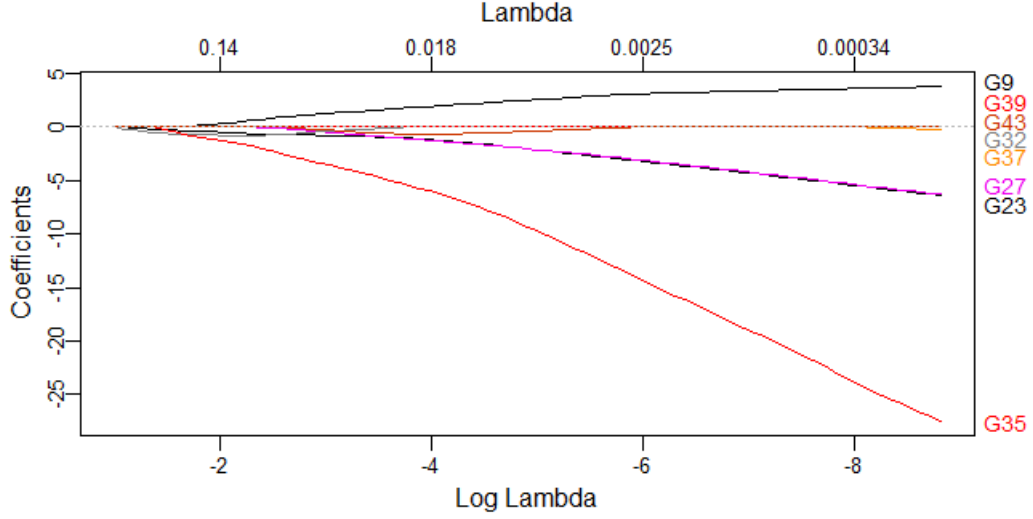


Şekil 4.12. 16 N-glikan değeri için gerçekleştirilen temel bileşen analizi sonuçlarının grafiksel gösterimi **A)** İlk iki temel bileşen ekseninde özvektörlerin varyansı **B)** İlk 10 özdeğer boyutunun toplam varyansa katkısı

4.4.5. Lasso Regresyon Analizi

PCA analizi sonucu birbirine benzer etkilere sahip olduğu belirlenen değişkenler arasından en iyi tanı modelini belirlemek amacıyla gruplar arasında anlamlı farka sahip 16 N-glikan değişkeni için regresyon analizi gerçekleştirildi. Bölüm 2.5.6’da bahsedildiği üzere geliştirilmiş regresyon modellerinin şartlarını sağlamayan (değişkenler arasında korelasyon, gauss dağılımına sahip olmayan vb.) veri setleri için optimize edilmiş bir regresyon modeli olan Lasso (En küçük bağlı daralma ve seçim operatörü) tekniği uygulandı.

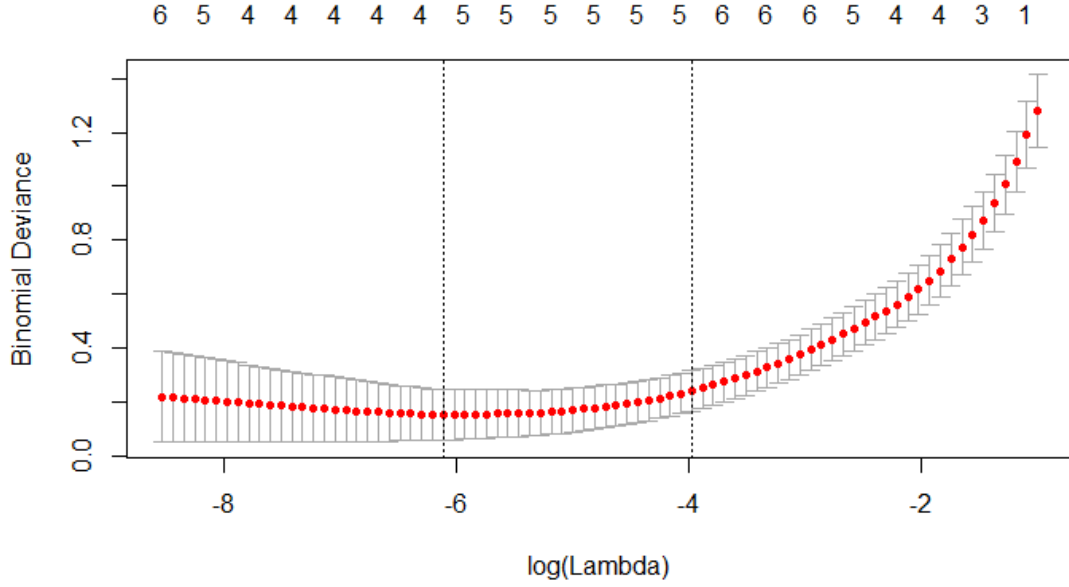
N-glikan değerleri ve kanser-kontrol durumu (1-0) iki matrisi olarak tanımlanarak model uygulanmış ve değişkenlere ait λ katsayıları ile oluşturulan grafikte görselleştirildi (Şekil 4.13). Şekilde herbir eğri bir değişkene karşılık gelmekte ve katsayı vektörünün değişen L1-norm değerine karşı aldığı değerleri göstermektedir. Yukarı yönlü eksen, geçerli λ ’da sıfır olmayan katsayıların sayısını ve Lasso için etkin serbestlik derecelerini (df) ifade etmektedir.



Şekil 4.13. Lasso analizi sonucu sıfırdan farklı λ değerlerine sahip olan N-glikan yapılarına ait katsayı değişim grafiği

Tanı modeline katkı yapan ve λ değeri sıfırdan farklı değişkenler arasından değişken seçimi için çapraz validasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla olasılık denkleminde anlamlı bir λ değerine sahip G9, G39, G43, G32, G37, G27, G23 ve G35 nolu N-glikanlarla oluşturulan yeni veri seti üzerine kanser-kontrol (1-0) örneklerinin farklı sayıda değişkene karşı doğru sonuç verme olasılıkları hesaplanmıştır. Şekil 4.14'teki grafik çapraz validasyon eğrisini (kırmızı noktalar), lambda değerinin logaritmasının binomial dağılıma (uygunluk testine) karşı değişimi ile göstermektedir. Eğri λ sekansı boyunca üst ve alt standart sapma eğrilerini (hata çubukları) içerir. Seçilmiş λ değerleri dikey çizgilerle ifade edilmektedir. Çizgiler arasındaki iki λ değeri minimum ortalama çapraz validasyon hatasını (λ_{\min}) ve λ_{\min} 'in 1 standart hatası içerisindeki en büyük lambda değerini (λ_{1Se}) ifade etmektedir. Bu iki değer arasındaki sıfır olmayan katsayı tahminleri değeri 5'tir. Yani 8 N-glikan değeri arasından en iyi tahmin yeteneğine sahip model 5 N-glikan içermelidir. Tahmin modelindeki tüm λ değerleri λ_{1Se} değerlerine dönüştürülülerek model seçimi tamamlandı (Tablo 4.7). Tablo 4.7'de çapraz validasyon sonucu binomial dağılımı en düşük olan λ değer aralığı içerisinde anlamlı katsayılarla sahip 5 N-glikan

olduğu görülmektedir. Buna göre kanser-kontrol örneklerde en iyi tahmin yeteneği gösteren model G9, G37, G27, G23 ve G35 numaralı N-glikan değerlerini içermektedir.



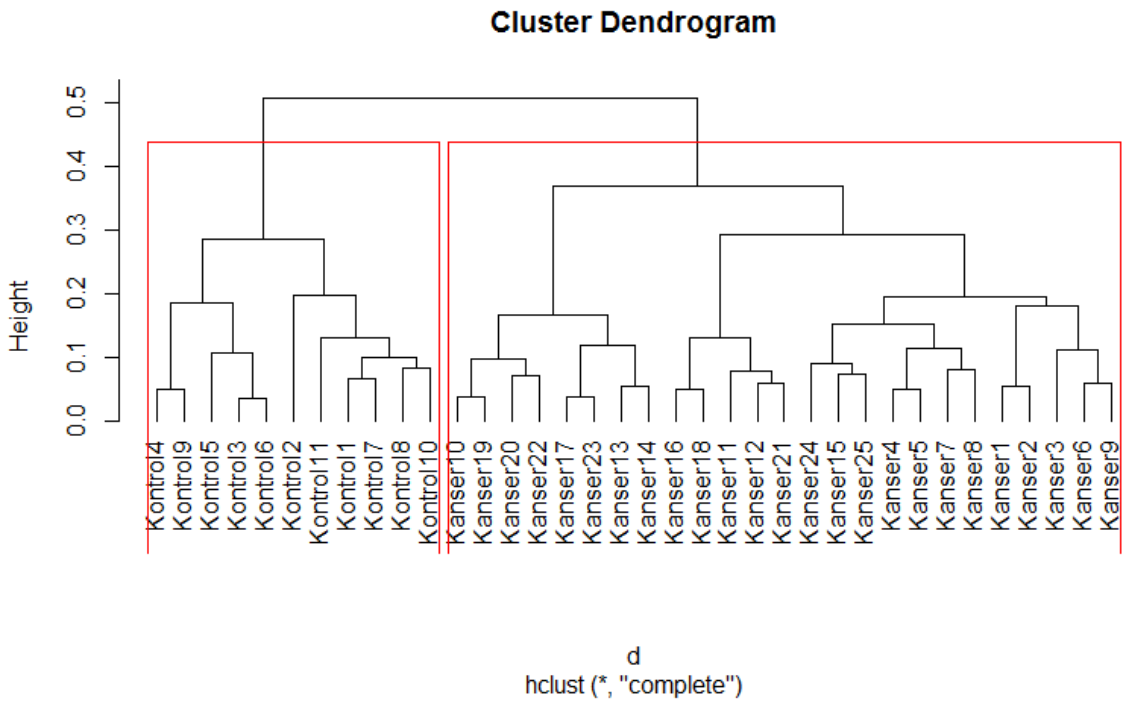
Şekil 4.14. Lasso değişken seçimi yöntemi ile belirlenen modellere ait binomial sapma değerleri

Tablo 4.7. Lasso algoritması ile geliştirilen tahmin modelindeki değişkenlere ait katsayı değerleri

	1		1
(Kesişim)	41.864	(Kesişim)	41.864
G9	3.653	G37	-0.056
G39	.	G27	-5.668
G43	.	G23	-5.743
G32	.	G35	-25.014

4.4.6. Kümeleme Analizleri

Lasso analizi ile elde edilen sonuçları numuneler üzerinde denemek amacıyla hiyerarşik kümeleme modeli veri setine uygulandı. Kümeleme için temel bağlama yöntemi (tek, tam, ortalama, merkezi ve *mcquitty*) arasından tam bağlanma yöntemi temel alınmıştır. Bu modele göre tüm bağımsız değişkenlerin bir arada etkisiyle oluşturulan iki boyutlu grafik üzerinde mümkün olan en uzun mesafeler kümeleri ayırmak için kullanıldı. Şekil 4.15'te Lasso modeli ile oluşturulan model için hiyerarşik kümeleme analizi sonucu elde edilen dendrogram verilmiştir. Hiyerarşik kümeleme yöntemi sonuçları iki boyutlu varyans ekseninde mümkün olan en uzun mesafelerle oluşturulabilecek iki temel küme önermiştir. Bunlardan birisi kontrol örneklerinden, bir diğeri kanserli örneklerden oluşmaktadır.

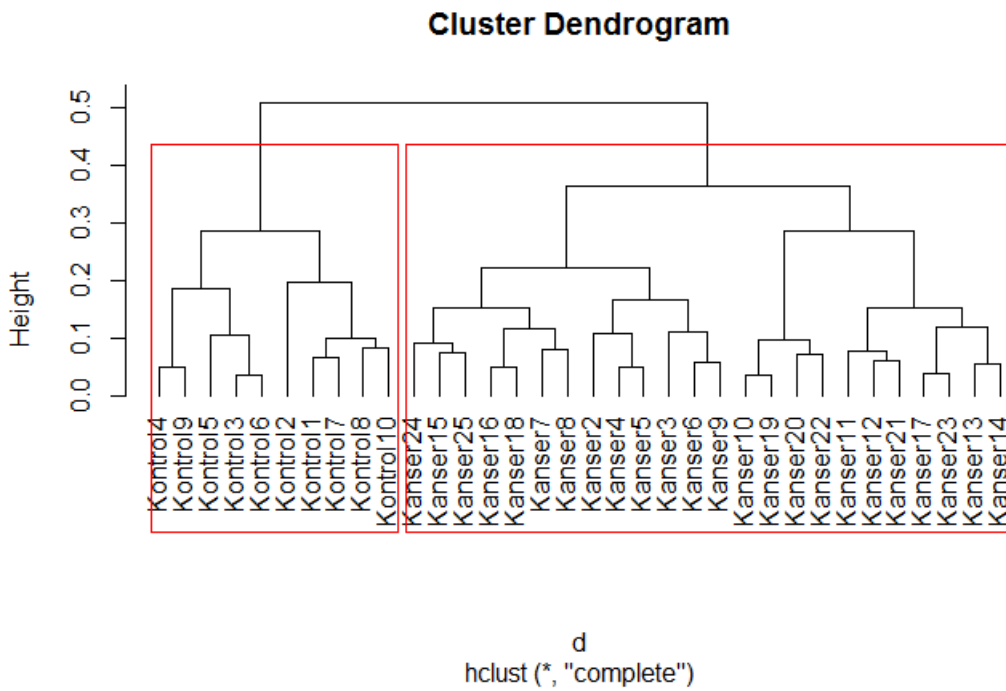


Şekil 4.15. Kanser-kontrol gruplarını tanımlamak için G9 (H7N2), G23 (H9N2), G27(H5N5F1), G35 (H5N5S2) ve G37 (H5N5F1S2) numaralı N-glikan ölçümleri ile oluşturulan kümeleme analizine ait dendrogram

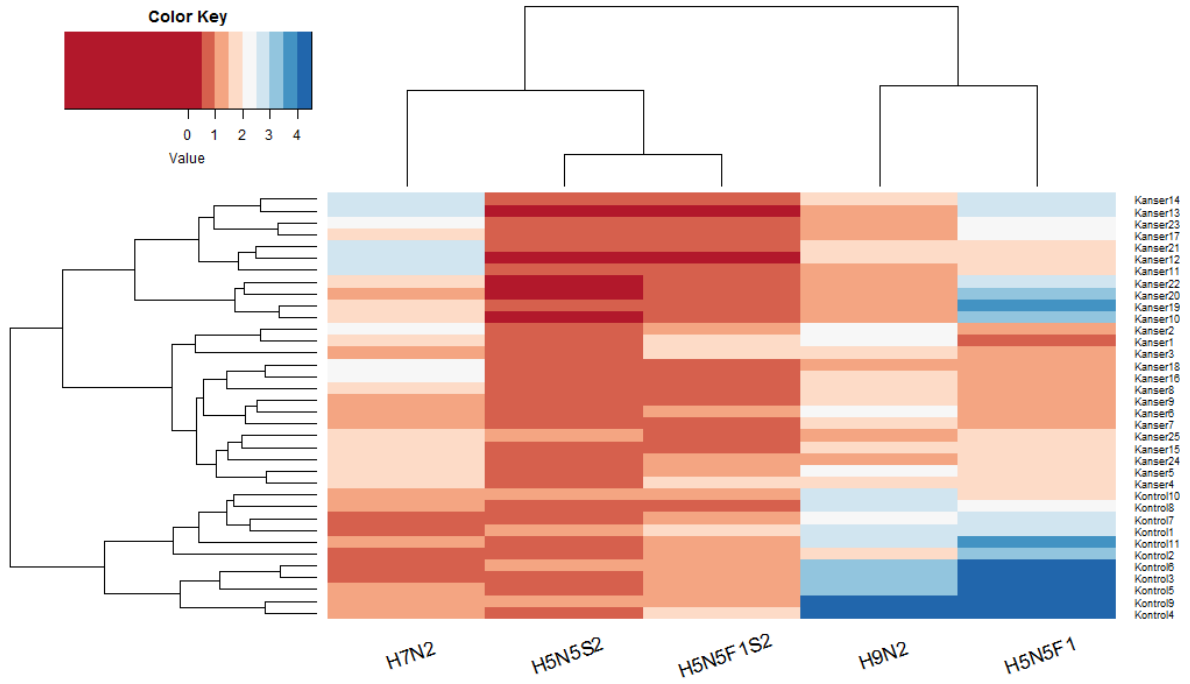
Hiyerarşik kümeleme analizini valide etmek üzere kanser-kontrol gruplarından birer numune veri setinden çıkarılarak kümeleme analizi tekrarlandı. İlk analizle aynı koşullar altında (tam bağlanma yöntemi) yapılan ikinci analizde sonuç değişmedi ve algoritma kanser-kontrol örneklerini başarılı bir şekilde tahmin edildi (Şekil 4.16).

Değişimin bir başka ifadesi olarak kümeleme analizi sonuçları ısı-haritası grafiği şeklinde gösterilmiştir (Şekil 4.17). N-Glikan grupları ve nükleer grade seviyelerine göre kanserli örnekler için yapılan hiyerarşik kümeleme çalışmaları başarılı olmamıştır.

Isı grafiğinde, kümeleme analizi için kullanılan N-glikan değerleri temel bileşen eksenlerinde en yüksek varyansa sahip olma sıralarına göre N-glikanların değişimleri görülmektedir (Şekil 4.15). Örnekler hiyerarşik kümelemeye göre, değişkenler ise kendi aralarındaki korelasyona göre gruplandırılmıştır.



Şekil 4.16. Hiyerarşik kümeleme analizi validasyon testine ait dendrogram



Şekil 4.17. Kanser-kontrol gruplarını tanımlamak için G9 (H7N2), G23 (H9N2), G27(H5N5F1), G35 (H5N5S2) ve G37 (H5N5F1S2)) numaralı N-glikan ölçümleri ile oluşturulan kümeleme analizine ait ısı-haritası grafiği

4.5. HPLC-HILIC-FD Yöntemi ile N-Glikanların Analizi

N-glikanların hidrofilik yapılarından faydalanarak gradient elüsyon yöntemiyle gerçekleştirilen hidrofilik etkileşim kromatografisi esaslı HPLC analizlerinde N-glikanlara ait alıkonma zamanlarının belirlenmesi amacıyla gözlemlenen pikler kromatografik bölgeler halinde analiz edildi. Başlangıç ve bitiş alıkonma zamanları dikkate alınarak belirlenen fraksiyonlar Şekil 4.18’de gösterilmektedir. Toplam 18 fraksiyon bölgesine (GP1-GP18) ait örnekler Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi sDHB matrisi kullanılarak ve MALDI plakası üzerine spotlanarak MALDI-TOF-MS ile analiz edildi. Fraksiyon bölgelerine ait MALDI-TOF-MS spektrumları Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 gösterilmiştir.

Fraksiyon bölgelerine ait spektrumlardaki N-glikan yapılarının m/z değerleri referans alınarak belirlendi (Tablo 4.8). Farklı bölgelere ayrılmış kromatografik piklerin bazılarında aynı N-glikan yapılarının olduğu görülmektedir. Bunlar;

- H4N3S1 (GP4 ve GP5),
- H5N4F1S1 (GP7, GP8, GP9, GP10 ve GP12),
- H5N4F1S2 (GP10, GP11 ve GP12),
- H5N4S1 (GP6, GP7, GP8 ve GP11),
- H5N4S2 (GP10 ve GP11),
- H6N5F1S2 (GP12, GP14 ve GP15),
- H6N5F1S3 (GP15, GP16 ve GP17),
- H6N5S2 (GP13 ve GP16),
- H6N5S3 (GP16 ve GP17) yapılarıdır.

Tespit edilen toplam N-glikan sayısı 41 iken bunların arasından aynı yapıya sahip olanlar çıkarıldığında 24 adet N-glikanın belirlendiği görülmektedir. Öte yandan 6 adet fraksiyonda tek bir N-glikan olduğu ve söz konusu yapıların tam bir ayırım ile elde edilebildiği gözlemlenmiştir. Bunlar;

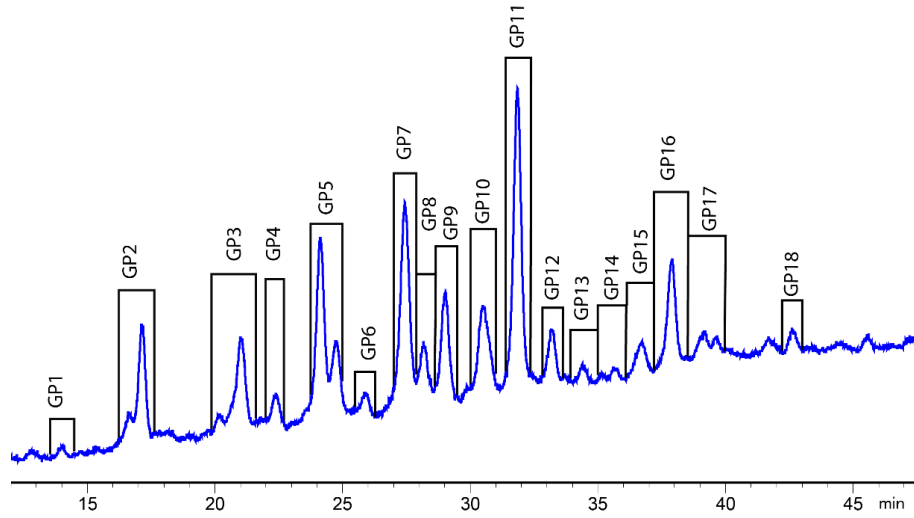
- H3N3F1 (GP1)
- H5N4S1 (GP6)
- H5N4F1S1 (GP9)
- H6N5S2 (GP13)
- H6N5F1S2 (GP14)
- H7N6S4 (GP18) yapılarıdır.

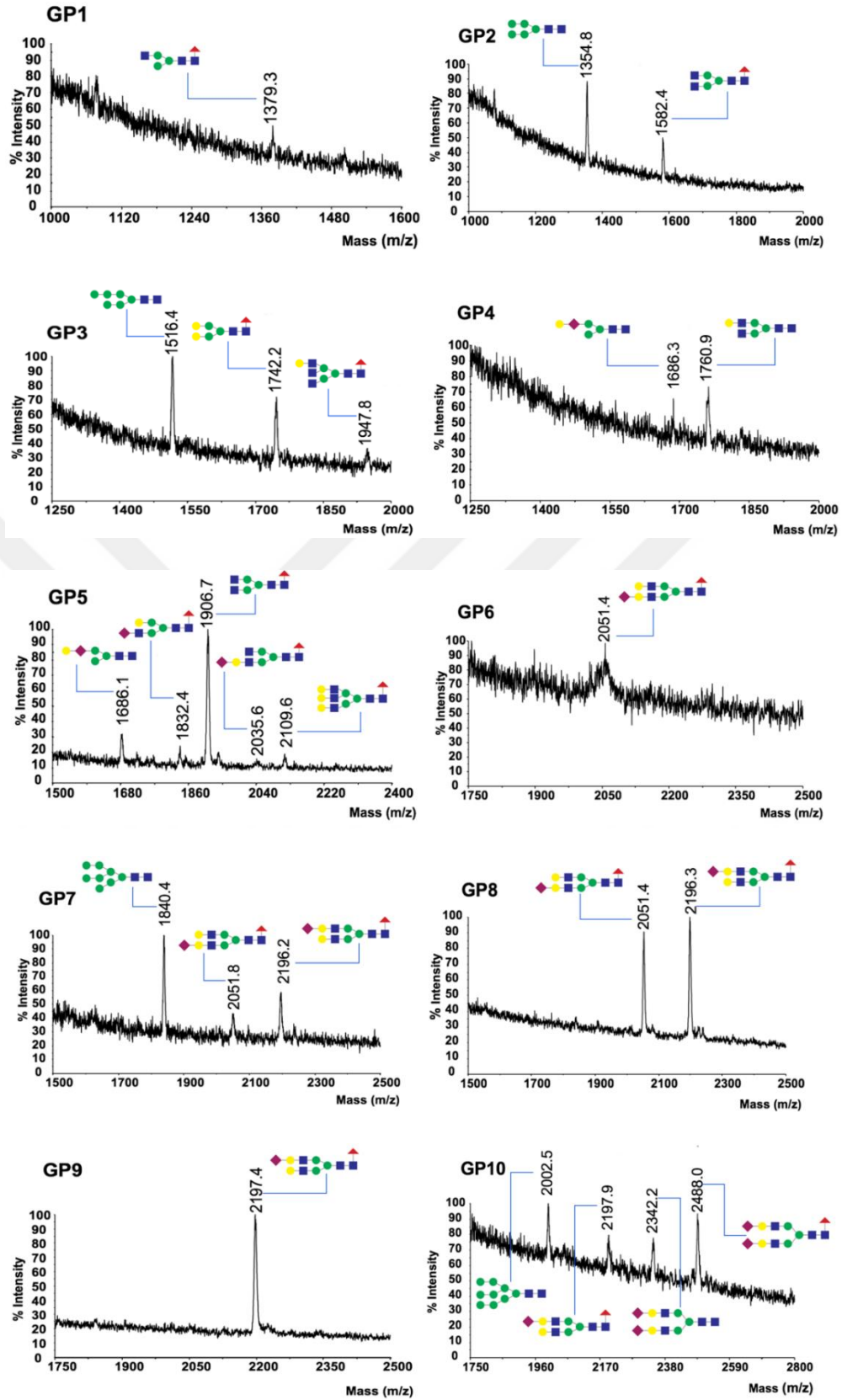
Tablo 4.8. HPLC-FD analizlerin elde edilen kromatograma ait fraksiyonların MALDI-TOF-MS spektrumlarında tespit edilen N-glikanlar

Glikan Pik Bölgesi	Alıkonma Zamanı (Başlangıç – Bitiş Noktaları, dk.)	N-glikan Sayısı	Kütle [M-H]⁻	N-Glikan	N-glikan kodu
GP1	13.8-14.3	1	1379.3	H3N3F1	G2
GP2	16-17.6	2	1354.8	H5N2	G1
			1582.4	H3N4F1	G6
GP3	19.8-21.4	3	1516.4	H6N2	G.4
			1742.2	H4N4F1	G12
			1947.8	H4N5F1	G21
GP4	22-22.75	2	1686.3	H4N3S1	G18
			1760.9	H5N4	G13
GP5	23.5-25	5	1686.1	H4N3S1	G10
			1832.4	H4N3F1S1	G22
			1906.7	H5N4F1	G20
			2035.6	H4N4F1S1	G25
			2109.6	H5N5F1	G27
GP6	25.5-26.4	1	2051.7	H5N4S1	G26
GP7	27-28	3	1840.4	H8N2	G17
			2051.8	H5N4S1	G26
			2196.5	H5N4F1S1	G28
GP8	28-28.5	2	2051.4	H5N4S1	G26
			2198.3	H5N4F1S1	G28
GP9	28.5-29.4	1	2197.4	H5N4F1S1	G28
GP10	30-31	4	2002.5	H9N2	G23
			2197.9	H5N4F1S1	G28
			2342.2	H5N4S2	G31
			2488	H5N4F1S2	G34
GP11	31.1-32.25	3	2051.4	H5N4S1	G26
			2342.1	H5N4S2	G31
			2488.1	H5N4F1S2	G34
GP12	32.5-33.6	3	2197.4	H5N4F1S1	G28
			2488.6	H5N4F1S2	G34
			2562.8	H6N5F1S2	G36

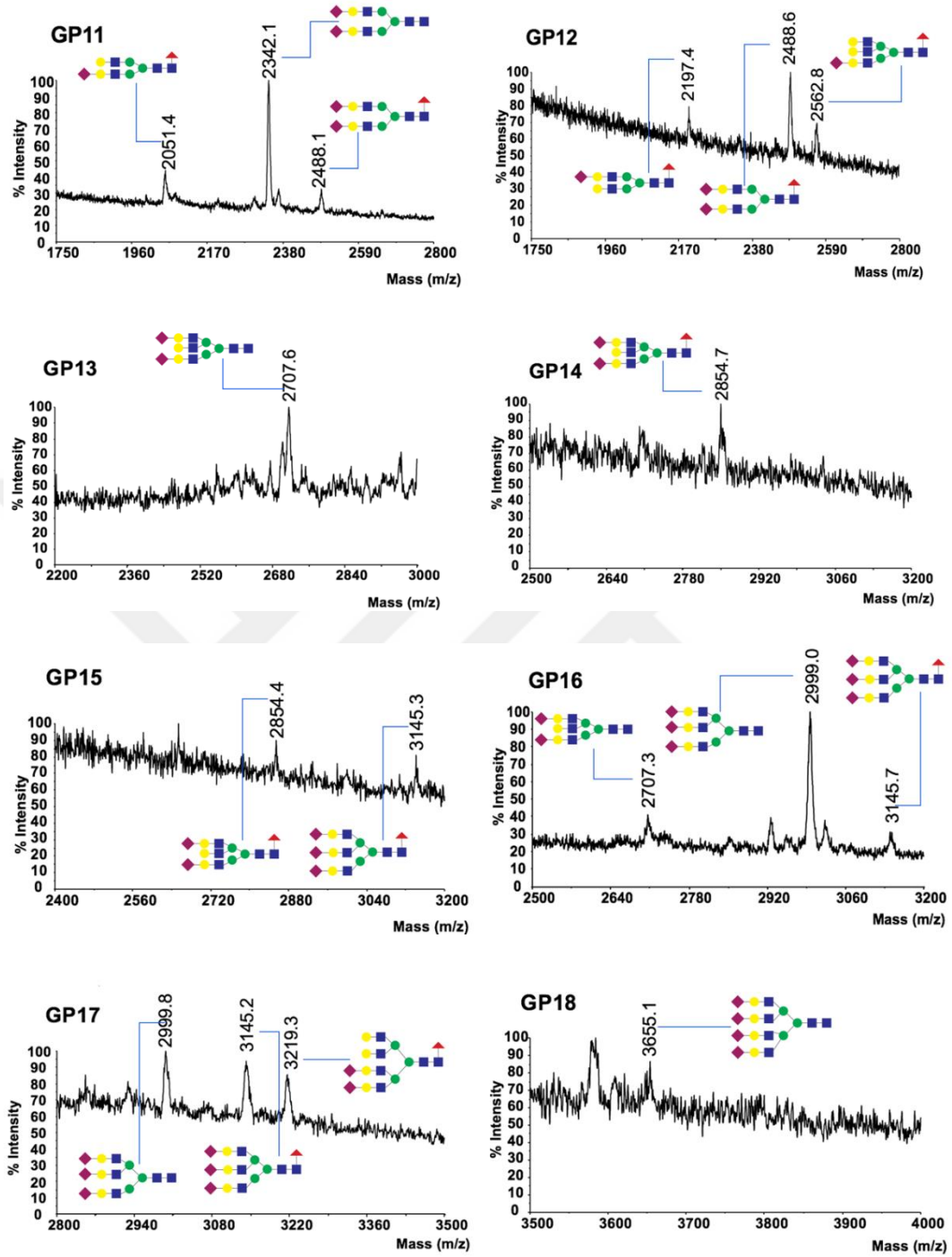
Tablo 4.8'in Devamı

Glikan Pik Bölgesi	Alıkonma Zamanı (Başlangıç – Bitiş Noktaları, dk.)	N-glikan Sayısı	Kütle [M- H]⁻	N-Glikan	
GP13	34-34.8	1	2707.6	H6N5S2	G38
GP14	35.5-36	1	2854.7	H6N5F1S2	G39
GP15	36.1-37.2	2	2854.4	H6N5F1S2	G39
			3145.3	H6N5F1S3	G42
GP16	37.5-38.5	3	2707.3	H6N5S2	G38
			2999	H6N5S3	G40
			3145.7	H6N5F1S3	G42
GP17	38.6-49	3	2999.8	H6N5S3	G40
			3145.2	H6N5F1S3	G42
			3219.3	H7N6F1S2	G43
GP18	42.5-43	1	3655.1	H7N6S4	G47
Toplam		41	24		

**Şekil 4.18.** HPLC-HILIC-FD ölçümleri ile gruplandırılan N-glikanların kromatogram üzerindeki konumları



Şekil 4.17. N-Glikanların HPLC-FD ölçümlerine ait fraksiyonların MALDI-TOF-MS spektrumları (GP1 – G10)



Şekil 4.18. N-Glikanların HPLC-FD ölçümlerine ait fraksiyonların MALDI-TOF-MS spektrumları (GP11 – GP18)

5. TARTIŞMA

Hastalıklar biyolojik sıvıların ve dokuların moleküler profillerinde spesifik değişimlere neden olmaktadır. Bu değişimler genetik, proteomik veya metabolomik bileşenlerinin analizi ile belirlenebilirler. Proteomik ve metabolomik analizler ortaya çıkardıkları bulgularla hastalıkların belirlenmesi için bir fırsat sağlarken, genetik analizler ilgili hastalıklara yatkınlığı olan bireyleri tanımlar ve uzun vadeli risklerin belirlenmesine yardımcı olur. Bu nedenle genler, proteinler ve metabolitler hastalık durumundaki biyolojik proseslerin anlaşılması için vazgeçilmez yardımcılardır¹⁵¹. Vücudun metabolik süreçleri tarafından üretilen moleküller, hastalıklı ve sağlıklı bireylerden elde edilen iki farklı numune seti arasında ayırım yapabilir. Bu ayırıcı bileşenler biyolojik belirteçler ya da biyobelirteçler olarak bilinirler. Bir biyobelirteç tek nükleotid polimorfizmleri, DNA metilasyonu veya mRNA, protein veya metabolit derişimleri arasındaki değişiklikler olabilir. Önemli olan bu değişimlerin hastalık ile ilişkili olmasıdır. Bir biyobelirtecin klinik uygulamaya uygun olması için %100'e yakın bir hassasiyet ve spesifikklik göstermesi gerekmektedir. Ayrıca testlerin yüksek doğruluğa sahip, ekonomik, kolay uygulanabilir ve farklı laboratuvarlarda farklı teknisyenler tarafından uygulanacağı için tekrarlanabilir olması beklenmektedir.¹⁵²

Bazı biyobelirteçler, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (US-FDA) tarafından spesifik kanserlerin izlenmesi için niteliksel testler olarak onaylanmış (örneğin mesane kanseri için nükleer matriks proteini-22) olmakla birlikte, keşfedilen potansiyel biyolojik belirteçlerin (proteinler veya metabolitler) çoğunluğu popülasyon taramasında kullanılacak kadar hassas ve/veya spesifik değildir. Klinik ve tıbbi biyobelirteçler, hastalığın erken teşhisi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve klinik sonuçların önceden tahmin edilmesi gibi birçok amaçla kullanılabilir. Kanser özelinde biyobelirteçler, klinik uygulamalarına göre kategorize edilebilir. Diagnostik (tanısal) belirteçler başlangıçta

hastalığın histopatolojik sınıflandırmasını ve evresini tanımlamak için kullanılırken, prognostik (öngörümse) belirteçler hastalığın gelişimini ve iyileşme ihtimalini önceden belirleyebilmek için kullanılırlar. Tek tek vakaları göz önünde bulundurarak öngörücü belirteçler doğru terapötik prosedürün seçimi için kullanılabilir. Protein modifikasyonlarını tanımlamak ve biyolojik sıvılardaki seviyelerini yüksek verimli bir şekilde açıklamak için önemli yöntem geliştirme çalışmaları yakın zamanda gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Günümüzde bu çalışmalar meyvelerini vermeye başlamıştır ve kanserle ilişkili olduğu düşünülen modifikasyon ürünleri bildirilmeye devam etmektedir.⁴³⁻⁴⁷

Bu çalışmada kanser tanısı konulan formalinle sabitlenerek parafine gömülü (FFPE) hale getirilen meme dokusu örneklerinin N-glikan içeriklerinin iki farklı yöntemle analiz edilerek farklılık gösteren glikozilasyon yapılarının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk basamağı olarak FFPE doku örneklerindeki proteinlerin glikozilasyon yapılarının izolasyonu için en uygun denaturasyon ve ekstraksiyon tekniği için araştırmalar yapılmıştır. FFPE dokulardan protein ekstraksiyonu için literatürde rapor edilen hemen hemen tüm protokoller, Shi ve Taylor⁷³ tarafından geliştirilen ve gerçekte immünohistokimyasal araştırmalarda antijen belirleme için tasarlanan ısı-destekli antijen geri kazanım (HIAR) tekniğinin bir varyasyonunu içermektedirler. Bu yöntem, bir deterjan veya proteini denatüre edici başka bir ajan içeren bir tampon çözelti içerisinde FFPE doku kesitlerinin 10-30 dakika süreyle 90-120 °C 'lik sıcaklıklara maruz bırakılmasını içerir. FFPE dokular ve aranan proteinler farklılık göstereceğinden, her ekstraksiyonda optimum koşulları elde etmek amacıyla farklı tamponlar, pH değerleri, tampon çözelti içerikleri ve inkübasyon sıcaklıkları değiştirilmektedir. Son dönemde rapor edilen yüksek hidrostatik basınç tek başına bir ekstraksiyon yöntemi değildir. Ancak geliştirilecek ekstraksiyon protokollerine eklenebilecek bir adım

konumundadır.¹⁵³ Çalışmamızda kullanılan FFPE doku örnekleri yüksek miktarda parafin içerdikleri için deparafinizasyon işlemi sırasında her bir numune 4 parçaya ayrılmış ve her bir parça 1 mL ksilen içerisinde ve 80 °C’de 15 dk karıştırıcı içerisinde bekletilmiştir. Ardından santrifüj edilen numunelerden ksilen içerisindeki parafin dekante edilmiştir. Böylelikle parafinin etkin bir şekilde uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından gerçekleştirilen denatürasyon işlemi her bir doku numunesi üzerine 100 µL denatürasyon tamponu eklenerek 99 °C’de 1 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Denatürasyon tamponu fazla eklendiğinde eppendorf tüp içerisindeki basıncı arttırarak kapağın açılmasına neden olduğu az eklendiğinde denatürasyon işleminin tamamlanmadığı gözlemlenmiştir.

N-glikan yapılarının ayrılmasında Bölüm 2.4.2’de bahsedildiği üzere (asparjine bağlı N-asetoglikozamin molekülünde α(1-3) pozisyonunda fukoz içeren glikanlar hariç) yüksek verimle ayırım sağlayan ve glikan yapılarının bozulmasına neden olmayan bir ekzoglikozidaz türü enzim kullanımı yoluna gidilmiştir. Bu grup içerisinde PNGase F’in glikoproteinlerden glikan yapılarını ayırmada PNGase H⁺ ve PNGase A’ya oranla çok daha yüksek etkinlik gösterdiği bilinmektedir¹⁵⁴. Nitekim çalışma numunelerinin tamamında 47 farklı N-glikan türünün başarılı bir şekilde izole edilmesi PNGase F etkinliğinin ilave bir kanıtı olarak değerlendirilebilir. PNGase F ‘i aktive etmek ve numune ile yüksek verimli inkübasyonunu sağlamak için üretici protokolüne uygun olarak reaksiyon tamponu (0,5 M Na₃PO₄), %10’luk NP-40 çözeltisi ve 1 µL PNGase-F enzimi kullanılmıştır. PNGase F aktivitesinin ayrılmış glikan yapılarına zarar vermemesi¹⁵⁵ nedeniyle maksimum ayırma etkinliği sağlamak amacıyla her bir numune için inkübasyona 1 gece boyunca devam edilmiştir.

Enzimatik reaksiyonla ayrılan ve çözelti içerisinde serbest halde bulunan N-glikan yapıları hem 2-AA hem ve etil esterifikasyon reaktifleri ile türevlendirilmiştir. Bunun

birincil amacı türevlendirme ile N-glikanların ayırım ve dedeksiyon özelliklerinin geliştirilmesidir. Glikanlar, kütle spektrometri cihazlarında efektif olarak iyonlaşmayan hidrofilik biyomoleküllerdir. İyonlaşma verimliliğini artırmak, nötr ve asidik glikanlar arasındaki iyonlaşma farklılığını ortadan kaldırmak için bir yöntem olarak türevlendirme yoğun olarak kullanılmaktadır. Permetilasyon, indirgeyici aminasyon ve hidrazid kimyası ile türevlendirmenin, glikanların ESI-MS ve MALDI-MS ile analizlerinde sinyal gücünü arttırdığı bilinmektedir. 2-AA reaktifinin etiketlemede sağladığı bir diğer avantaj yapıya floresan özellik kazandırmasıdır ¹⁵⁶. Bu sayede çalışmamızda kullanılan MALDI-TOF-MS ve HPLC-HILIC-FD yöntemleri ile aynı numuneler üzerinde analiz gerçekleştirildi. Etil esterifikasyon yöntemiyle türevlendirilen numunelerin MALDI-TOF-MS analizlerinde beklenenin çok altında bir sinyal gücü görüldü. Aynı numunelerin HPLC-HILIC-FD sistemi ile analizinde neredeyse hiç sinyal gözlenemedi. Bu nedenle çalışmanın tamamında 2-amino benzoik asitle (2AA) etiketleme yöntemi kullanıldı.

Türevlendirmenin iyonlaşma etkinlikleri üzerindeki iyileştirici etkisine rağmen glikanların karmaşık biyolojik numuneler içerisinde MS-temelli analitiksel yöntemlerle analizi için ilave saflaştırma ve zenginleştirme çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Saflaştırma ile spektrum üzerinde gürültüye neden olan biyomoleküller uzaklaştırılırken, zenginleştirmeyeyle düşük derişimleri nedeniyle teşhis limitinin altında bağıl bolluk gösteren glikanların tespit edilmesi mümkün olmaktadır¹⁵⁷. Çalışmamızda katı-faz ekstraksiyon ile saflaştırma ve zenginleştirme işlemi Ziptip hidrofilik ektileşim kartuşları ve cam pamuğu ile hazırlanmış pipet uçları ile aynı numuneler üzerinde denendi. Aynı prosedürle uygulanan bu iki yöntem arasında glikan geri kazanımı açısından bir farklılık olmadığı görüldü ve cam pamuğu pipet uçları ile deneye devam edildi. Bu sayede saflaştırma ve zenginleştirme işleminde ticari bir ürün olan Ziptip hidrofilik kartuşların yüksek maliyeti elimine edildi.

MALDI-TOF-MS analizleri negatif, lineer modda (kütle aralığı 1000-4000 Da) ve 20 kV hızlandırma potansiyeli uygulanarak gerçekleştirildi. N-glikanların 2-amino benzoik asit (2-AA) reaktifi ile indirgen uçlarından etiketlenmeleri durumunda MALDI analizlerinde negatif modda çalışılmasının daha yüksek bir iyonlaşma sağladığı bilinmektedir. Bunun nedeni asidik glikanlarla birlikte yüksüz glikanların da negatif yükte iyonlaşabilmesidir¹⁵⁶. 1000- 4000 Da aralığında yapılan tarama 47 adet N-glikan yapısının tespitine olanak tanımaktadır. MS spektrumları, ön denemelerle en az gürültü ve en yüksek bağıl bolluğun elde edildiği belirlenen 2000 Hz frekans gücüne sahip lazerle 500 lazer atışı ile edildiler.

MALDI-TOF-MS sonuçları için veri analizlerinde etiketli N-glikanlara ait kütle/yük oranları literatür bilgisi ve online veritabanları üzerinden belirlendi ve her bir örnekteki 47 adet N-glikanın toplam intensitesi 100 kabul edilerek N-glikanlara ve N-glikan gruplarına ait bağıl intensiteler hesaplandı. Kanseri ve kontrol grupları arasında farklılık gösteren yapıları ortaya koymak amacıyla yapılan student t-testi sonuçları 16 adet N-glikanda $p < 0,001$ seviyesinde, 8 adet N-glikan yapısında ise $p < 0,05$ seviyesinde anlamlı farklılık gözlemlendi. N-glikozilasyon grupları için yapılan t-testi sonuçları 6 grupta $p < 0,001$ seviyesinde ve 8 grupta $p < 0,05$ seviyesinde anlamlı farklılık olduğu görülmüştür.

N-glikan gruplarının tanı tahmin yeteneklerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen ROC analizleri 6 grubun tamamında doğru sonuçlara yakın tahminler verdiğini göstermiştir. Tek antenli N-glikanların bağıl değerlerinde oluşan grup (GG4) için yapılan testte duyarlılık ve özgünlük değerleri sırasıyla %88.0 ve %90.9 olarak, AUC değeri 0.920 olarak bulunmuştur. Bu yönüyle ROC eğrilerinde mükemmel olarak değerlendirilen 0.9 -1 AUC kategorisi içerisinde ve oldukça güçlü bir tanı tahmin yeteneğine sahip olduğunu söylenebilir.

İki antenli N-glikanlar (GG5) için yapılan ROC testi % 76.0 duyarlılık, %90.9 özgünlük değerleri ve 0.865 AUC değeri ile “iyi” kategorisi içerisinde bir tahmin yeteneği göstermiştir. Benzer şekilde üç antenli N-glikanlar (GG6) için yapılan ROC testi sonucu % 80.0 duyarlılık ve %90.9 özgünlükle ile AUC değeri 0.862 olarak bulunmuştur. Üç antenli N-glikan yapılarında kanserli örneklerde fazla olmasının yanı sıra kontrollere kıyasla ayırt edici bir özellik gösterdiği söylenebilir. Yine bu kapsamda incelenen ve anten üzerinde galaktozilasyonu olan N-glikan yapılarını içeren GG10 nolu grupta duyarlılık ve özgünlük değerleri sırasıyla %76.0 ve %81.8 olarak, AUC değeri ise 0.829 olarak belirlenmiştir. 0.8-0.9 kategorisi içerisinde bu grubun “iyi” bir tahmin yeteneğine sahip olduğu söylenebilir. GG13 nolu simetrik N-glikanlar yine 0.851 AUC oranıyla yüksek bir tahmin yeteneği göstermiştir. Bu grup için duyarlılık değeri %72.0 ve özgünlük değeri %90.9 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre simetrik N-glikan yapılarında duyarlılığın yani hasta bireyler arasından tespit edilebilen hasta sayısının düşük olduğu görülmektedir. GG15 nolu simetrik iki antenli fukoatlanmış N-glikan yapılarında duyarlılık ve özgünlük değerleri sırasıyla %76.0 ve %90.9 olarak bulunmuştur. AUC değeri 0.880 olan bu grupta iyi bir tanı yeteneği olması, N-glikanların bireysel olarak incelendiği gruplarda farklılık gösteren yapıların fukoatlanmış N-glikanlar olması düşünüldüğünde şaşırtıcı değildir.

Kanserin ilerleme durumuna bağlı olarak N-glikan profillerinde bir değişimin olup olmadığını belirlemek için sadece kanserli örnekler arasında nükleer derecelere göre (Nükleer grade 2 ve 3) anlamlı farklılık *Kruskal Wallis* testi ile değerlendirilmiştir. *Kruskal Wallis* parametrik olmayan istatistiksel farklılık testlerinden birisidir ve veri seti student-t testi için gerekli öngörülerini karşılamadığında kullanılır¹⁵⁸. Veri setindeki kanserli örneklem sayıları 25 adet olduğundan (n<30) bu analizlerde *Kruskal Wallis* testi kullanılmıştır. Sonuçlar bir adet N-glikan yapısında ve iki N-glikozilasyon grubundan

$p < 0.05$ seviyesinde bir farklılık ortaya koymuştur (Tablo 4.4). Bir başka değişle, kanser-kontrol numuneleri arasında ciddi bir farklılık ortaya çıkarken kanserin ilerleme seviyesine bağlı olarak N-glikozilasyon profillerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Biyobelirteç potansiyeli araştırmalarında kesinliği arttırmak amacıyla sadece $p < 0.001$ seviyesinde anlamlı farklılığa sahip değişkenler kullanıldı. Bu yapıların bazıları kanserli numunelerde bazıları ise kontrol numunelerinde artış göstermekteydi. Ancak Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'deki kutu çizim grafiklerinde ifade edildiği üzere ortalama değerleri birbirinden farklı olsa da N-glikanlara ait uç değerlerin iki grubun değer dağılımı arasında girişim yaptığı görüldü. Tek başına bir N-glikan veya N-glikan grubu değerinin kanser ve kontrol numunelerini spesifik olarak birbirinden ayırmaması nedeniyle çalışmanın devamında bu değerlerin istatistiksel olarak bir arada değerlendirilmesi yoluna gidilmiştir. Öncelikle değişkenler arasındaki korelasyonu belirlemek amacıyla korelasyon testi üç temel korelasyon tekniğinden (Spearman, Kendall ve Pearson) birisi olan *Spearman* korelasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Spearman korelasyon katsayıları (r) grafiği (Ek 1-D) N-glikan değerleri arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Özellikle basit N-glikan yapıları ile daha kompleks N-glikan yapıları kendi aralarında doğrusal, iki grup arasında ise ters bir korelasyona sahipti. Bu sonuçlara dayanarak kanserli örneklerde basit yapılı (düşük molekül ağırlığı ve az bağlanma yapılarına sahip) N-glikanların kanserli örneklerde kontrollere oranla daha fazla görüldüğü, kompleks yapıların ise kontrollerde sistematik olarak artış gösterdiği söylenebilir.

Biyolojik numuneler üzerinde glikomiks araştırmaları yapılan çalışmalarda birçok istatistiksel testin kullanıldığı görülmektedir. Özellikle biyobelirteç araştırmalarında iki ya da daha fazla gruba ait ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını değerlendiren varyans analizi (ANOVA)^{116, 118, 123}, bağımsız değişkenlerin toplam etkisini

inceleyen temel bileşen analizi (PCA)¹¹⁵, belirli bir tanım aralığında sürekli değerler alan bir değişkenin (sürekli değişken) tanı testi olarak kullanımını amaçlayan ROC eğrisi analizi kullanılmıştır.¹¹⁷ Buna ek olarak varyans analizini çoklu değişkenler üzerinde inceleyen ANCOVA/MANCOVA¹²⁵ yöntemleri ve birden fazla değişkenin bir olasılık üzerindeki etkisini inceleyen ikili (*Binary*) lojistik regresyon³⁹ teknikleri –omiks çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

N-glikan değerleri arasındaki yüksek korelasyon, değişkenlerin bağımsızlığını azaltmakta ve biyobelirteç testleri için kullanılacak ikili lojistik regresyon, alıcı işletim karakteristiği (ROC) gibi ikili sınıflandırma sistemi yeteneğini ölçen modellerde hataya neden olmaktadır. Veri setine uygulanan ikili lojistik regresyon testleri de aynı nedenle başarısız oldu. Bu nedenle 16 değişken arasından veri setini temsil eden en önemli değişkenleri belirlemek amacıyla temel bileşen analizleri (PCA) veri setine uygulandı. PCA sonuçları veri setindeki değişkenlerin özvektörler olarak ilk iki özdeğer ekseninde yüksek bir varyansa sahip olduğunu (toplam varyansın %76'sı) göstermiştir. Ek 1-F 'de PCA analizi ile elde edilen 16 kovaryans ekseninden oluşan karesel matrisler gösterilmektedir. Kullandığımız veri seti 16 değişkenden oluştuğu için, ilk iki ekseninde elde edilen %83.8'lik varyans oranı veri seti hakkında önemli bilgiler verdiğini göstermekteydi. Ancak beklenenin altından bir temsil yeteneğine sahip olması nedeniyle başarısız kabul edildi.

Çalışmanın devamında tanı modeli oluşturmak üzere veri setine Lasso regresyon testi uygulandı. Lasso yüksek kolerasyona sahip çoklu veri setlerine sıklıkla uygulanan bir boyut azaltma yöntemidir ve N-glikanlar için literatürde uygulamaları mevcuttur.^{159, 160} Lasso sonuçları 5 N-glikan değişkeninin (G9 (H7N2), G23 (H9N2), G27(H5N5F1), G35 (H5N5S2) ve G37 (H5N5F1S2)) kanser-kontrol grupları arasında tahmin yeteneğine

sahip bir model olduğunu öngörmüştür Geliştirilen istatistiksel modeli doğrulamak üzere hiyerarşik kümeleme analizi gerçekleştirilmiştir.

Hiyerarşik kümeleme modeli pozitif ve negatif ayrıma neden olan bir sınır değeri belirleyerek kanserli ve kontrol numunelerini eksiksiz olarak birbirinden ayırmıştır. Şekil 4.15'te verilen kümeleme dendrogramında kanser-kontrol örneklerinin iki küme arasındaki dağılımını göstermektedir. Hiyerarşik kümeleme analizini valide etmek amacıyla kanser ve kontrol örneklerinden birer tanesi çıkarılarak ikinci bir kümeleme analizi yapılmıştır. Sonuçlar ilki gibi başarılı olmuştur (Şekil 4.16). Böylelikle modelin gruplar arasındaki etkisinin rastgele olmadığı kanıtlanmıştır. N-glikanların örnekler üzerindeki etkisini belirtmek amacıyla kümeleme dendrogramı ile değişkenlerin korelasyonu ısı grafiği üzerinde görsel hale getirilmiştir (Şekil 4.17). Isı grafiğinde kanserli doku örnekleri kontrollerden farklı olmakla birlikte kendi içerisinde yüksek bir dağılıma sahip olduğu ve 3 alt değer kümesi altında toplandığı görülmektedir. Bir başka ifadeyle bu 5 N-glikan değeri kanser-kontrol gruplarını sınıflandıracak derecede bir farklılık ifade etmemekte ancak birarada değerlendirildiklerinde sınıflama yeteneği göstermektedirler.

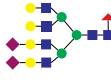
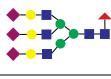
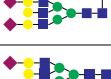






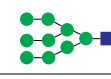
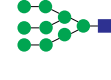
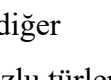

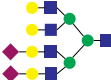
Tablo 5.1'de N-glikanların meme kanseri biyobelirteç potansiyellerini araştıran kaynaklardaki çalışmalara ait sonuçlar görülmektedir. Kyselova ve ark.¹¹⁶ tarafından farklı evrelerdeki meme kanseri hastalarının kan serumlarında yapılan N-glikan analizinde kanser ilerlemesi sonucu farklılık gösteren yapılarda siyalilasyon ve fukozilasyona uğramış yüksek molekül ağırlıklı yapılar göze çarpmaktadır. Çalışmamızda da kümeleme analizinde kullanılan N-glikanlardan ikisi fukozlanmış üç siyalilli yapılardır. Alley ve ark.¹¹⁷ gerçekleştirdikleri çalışmada N-glikan yapıları ANOVA ile birbirinden bağımsız incelenmiştir. Çalışma sonucunda monosiyalillenmiş iki-antenli bir N-bağlı glikan ve bir fukosilatlı trianten-trisiyalillenmiş bir yapının kanserli

örneklerde artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak sonuçların kanserli örneklerde sialilli glikan düzeyinde genel bir azalma ve fukozlanmış glikanların artış gösterdiği sonucuna varmışlardır. Fukozlu türlerde ve iki antenli yapılarda görülen artış çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir.






Benzer çalışmalarda De Leoz¹¹⁸ ve ark. m/z değerleri sırasıyla 1339,480 (H3N4), 1485,530 (H4N4), 1809,639 (H4N4S1F1) ve 1905,630 (H9N2) olan N-glikan yapılarının meme kanseri progresyonu ile artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Söz konusu yapılardan (H9N2) G23, çalışmamızda biyobelirteç potansiyeli olduğu düşünülen 5 adet N-glikandan birisidir.

An ve ark.¹¹⁹ yüksek mannozlu türlerin, Abott ve ark.¹²⁰ -1,6-N-asetillaktozamin (β -1,6-GlcNAc) içeren dört dallı N-bağlı glikan yapılarının ve Abd Hamid ve ark.¹²¹ üç antenli ve α 1,3 bölgesinden fukozlanmış N-glikan türünün yüksek miktarları ile meme kanseri biyobelirteç potansiyeline sahip olduklarını bildirmişlerdir. Saldova ve ark.¹⁶¹ insan serum N-glikan yapılarında siyalilasyon, dallanma ve çekirdek dışı fukozilasyonunda kontrollere oranla genel bir artış görülürken, yüksek molekül ağırlıklı ve çekirdekten fukozlanmış iki anteni yapılarda azalma olduğunu bildirmişleridir. Çalışmamızda biyobelirteç olarak önerilen 5 adet N-glikandan (G27 (H5N5F1) ve G37 (H5N5F1S2)) kodlu yapılar bahsedilen yüksek molekül ağırlıklı ve çekirdekten fukozlanmış iki anteni yapılarıdır ve sonuçlar anlamlı bir artış olduğunu ifade etmektedir. Ancak iki antenli yapıların geneline bakıldığında kanserli örneklerde önemli bir artış gösterdiği ve hatta tanı yeteneği testlerinde çok iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Meme kanseri için yapılan tüm bu glikomiks çalışmalarının sonuçları incelendiğinde siyalilasyon, dallanma ve fukozilasyonda genel bir artış bildirildiği görülmektedir. Öte yandan yüksek molekül ağırlıklı yapıların kanser durumu ile azalması yine çalışmamızla uyumlu bir sonuçtur.

Tablo 5.1. Meme kanseri biyobelirteçleri olarak önerilen N-glikan yapıları

Örnek Türü	Kanserde Düzeyi	N-glikan kompozisyonu	İstatistiksel Yöntem	Kaynak
İnsan Serum	Artan		ROC & ANOVA	Kyselova ve ark. ¹¹⁶
	Artan			
	Artan			
	Azalan			
	Azalan			
İnsan Serum	Artan		ANOVA	Alley ve ark. ¹¹⁷
	Artan			
	Azalan	Siyalil içerenler		
	Artan	Fukoz içerenler		
Sıçan Serum	Artan		ANOVA – Dixon Q-testi	De Leoz ve ark. ¹¹⁸
	Artan			
	Artan			
	Artan			
İnsan ve fare kök hücre	Artan	 ve diğer yüksek mannozlu türler	Spektrum Analiz (Peptid Prophet Algorithm) Peptid bollukları üzerinden	An ve ark. ¹¹⁹
İnsan doku	Artan	 4 dallı ve β -1,6-GlcNAc bağlı N-glikanlar	Bağlı bolluklar üzerinden Densitometrik Analiz	Abott ve ark. ¹²⁰
İnsan serum	Artan		PLS-DA	Abd Hamid ve ark. ¹²¹

Tablo 5.1'in Devamı

Örnek Türü	Kanserde Düzeyi	N-glikan kompozisyonu	İstatistiksel Yöntem	Kaynak
İnsan Serum	Artan	siyalilasyon, dallanma ve çekirdek dışı fukozilasyonunda	ANOVA	Saldova ve ark. ¹⁶¹
	Azalan	Yüksek molekül ağırlıklı ve çekirdekten fukoatlanmış iki anteni yapılar		
İnsan FFPE Doku Örnekleri	Artan		t-testi-wilcoxon	Bu çalışma
	Azalan		ROC, PCA, Lasso,	
	Azalan		Hiyerarşik Kümeleme	
	Azalan			
	Azalan			
	Artan	Tek Antenli N-Glikanlar		
	Artan	İki Antenli N-Glikanlar		
	Artan	Üç Antenli N-Glikanlar		
	Azalan	Anten Üzerinde Galaktozilasyonu Olan N-Glikanlar		
	Azalan	Simetrik İki Antenli N-Glikanlar		
Azalan	Simetrik İki Antenli, Fukoatlanmış N-Glikanlar			

HPLC-HILIC-FD yöntemi N-glikanların analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir ve literatürde birbirinden farklı yöntem şartlarının kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Tablo 5.2’de HPLC-HILIC-FD sistemi ile N-glikan analizlerinin gerçekleştirildiği daha önce bildirilmiş çalışmalara ait yöntem parametreleri hakkında bilgiler verilmektedir. Yöntem için değişmeyen altın standart floresan özellikli etiketleme reaktifleri sayesinde tüm N-glikan yapıları için aynı olan eksitasyon ve emisyon dalga boylarıdır (330 – 420 nm) ¹²⁶. Ayrıca çalışmamızda da kullandığımız *TSK Gel-Amide 80* tipi normal faz HPLC kolonunun yüksek ayırma gücü ile N-glikan analizinde sıklıkla kullanıldığı görülmektedir ¹²⁶⁻¹²⁸. Benzer şekilde çalışmamızda olduğu gibi önceki çalışmalarda da pH 4,4 noktasına ayarlanmış bir tampon çözelti ve asetonitrilden oluşan iki çözücüden oluşan hareketli faz sistemlerinin kullanıldığı görülmektedir. Floresans ölçümlerde intensitenin pH değerine son derece bağımlı olması N-glikan analizinde bu pH değerini standardize etmektedir. Sistem ACN oranının yüksek olduğu bir karışımla kolona yüklemenin ardından su oranının doğrusal bir şekilde artırılması ile elüsyonu sağlamaktadır. N-glikanların hidrofilik karakteri sayesinde bu bir dereceye kadar mümkündür. Ancak benzer kimyasal özelliklere sahip iki glikanın (örneğin yüksek mannozlu iki tür) kolonu ard arda terk etmesi kromatogram üzerinde bu iki türe ait piklerin girişim yapmasına neden olmaktadır. Bu nedenle genel olarak glikanların kromatogram bölgeleri halinde bir arada incelenmesi yoluna gidilmiştir. Stanta ve ark. ¹²⁸ hasta serumlarında gerçekleştirdikleri analizde N-glikanları 6 kromatografik grup halinde incelemişler ve bu altı gruba ait atık çözeltileri MALDI-TOF-MS ile doğrularak numunelerde toplam 22 adet N-glikan türünü tanımlamışlardır. Ruhaak ve ark. ¹²⁷ serum örneklerinde cinsiyet ve yaşa bağlı olarak N-glikan türlerindeki değişimleri inceledikleri çalışmalarında 26 adet N-glikan türünü gözlemlemişlerdir.

Tablo 5.2. HILIC-FD yöntemi ile N-glikan analizi konusunda daha önce bildirilmiş çalışmalarda uygulanan parametreler

HILIC kolon tipi ve Sıcaklığı	Etiketleme Ajanı	Uygulanan Numune	Hareketli Faz	Yöntem Şartları	Referans
ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å, 1.7 µm (40 °C)	2-AB	İnsan serum örnekleri	A: 50 mM formik asit/amonyum format pH 4.4 B:ACN	Gradient elüsyon, 0,56 mL/dk akış hızı 30 dk. Analiz süresi	Saldova ve ark. ¹²²
TSK Gel-Amide-80 (45 °C)	2-AB	Biyofarmasötik tipi rekombinant ilaç ürünü	A: 60 mmol/L amonyum format içeren %75'lik ACN çözeltisi B: 115 mmol/L Amonyum format içeren % 54'lük ACN çözeltisi	Gradient elüsyon, 0,2 mL/dk akış hızı, 183 dk. analiz süresi	Melmer ve ark. ¹²³
TSK Gel-Amide-80 (30 °C)	2-AB	İnsan serum örnekleri	A: 50 mM formik asit - pH 4,4 B: ACN	Gradient Elüsyon, 0,4 mL/dk akış hızı, 180 dk. analiz süresi	Royle ve ark. ¹²⁶
TSK Gel-Amide-80 (Değişken sıcaklık)	2-AA	İnsan plazma örnekleri	A: ACN B: 50 mM amonyum format pH 4,4	Gradient Elüsyon,değişken akış hızı, 106 dk. analiz süresi	Ruhaak ve ark. ¹²⁷
TSK Gel-Amide-80 (30 °C)	2-AB	İnsan plazma örnekleri	A: 50 mM formik asit pH 4,4 B: ACN	Gradient elüsyon, değişken akış hızı, 60 dk. analiz süresi	Knezevic ve ark. ¹⁶²
TSK Gel-Amide-80 (30 °C)	2-AB	İnsan serum örnekleri	A: 50 mM formik asit pH 4,4 B: ACN	Gradient elüsyon, 0,8 mL/dk. akış hızı, 152 dk. analiz süresi	Stanta ve ark. ¹²⁸
TSK Gel-Amide-80 (30 °C)	2-AB	İnsan serum örnekleri	A: 50 mM formik asit pH 4,4 B: ACN	Gradient elüsyon, değişken akış hızı, 180 dk. analiz süresi	Arnold ve ark. ¹²⁵

Çalışmamızda HPLC-HILIC-FD yöntemi ile 18 farklı kromatografik grup tespit edilerek bunlara ait N-glikan içeriği MALDI-TOF-MS analizleri ile teyit edilmiş ve bu yolla 41 adet N-glikan yapısı tanımlanmıştır. Saflaştırma ve zenginleştirme sonucu MALDI-TOF-MS analizinde tanımlanan 49 adet glikandan kalan 8 tanesi kromatogram üzerinde görüntülenememiştir. Bunun muhtemel nedeni olarak kolona yüklenen bu türlerin FD dedektör sinyali verecek düzeyde bir derişime sahip olmadıkları ve teşhis limitinin altında kaldıkları söylenebilir. Kalitatif olarak belirlenen N-glikan türlerinin alıkonma zamanları ve sıralamaları literatürle örtüşmektedir. Daha düşük moleköl ağırlığına sahip glikan yapıları kolonu önce terk ederken, hibrit türlerin ve kompleks N-glikanların kolonu daha geç terk ettiği görülmektedir.

Dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanserinin tanısı hala karmaşık ve zordur.¹⁶³ Meme kanseri tanısında başarılı ve FDA tarafından onaylı iki biyobelirteç olan karsinoembriyonik antijen (CEA) ve serum kanser antijeni 15-3 (CA 15-3) sahip oldukları düşük duyarlılık ve özgünlük nedeniyle sadece meme kanseri prognozunu doğrulamak ve progresyonun izlenmesinde kullanılabilirler.¹⁶⁴ Bu sınırlama, glikomiks alanında çalışan araştırmacıları daha güvenilir, hassas ve spesifik glikomik diyagnoz yöntemlerinin geliştirilmesi potansiyelini araştırmaya yönlendirmiştir.¹⁶⁵

Bildirilen çalışmalarda tek bir N-glikan yapısı, birden çok N-glikan yapısı ve benzer özellikteki N-glikanlar oluşan grupların kanserli-kontrol örneklerinde karşılaştırılması ile elde edilen sonuçlar üzerinden biyobelirteç olarak önerildikleri görülmektedir (Tablo 5.2). Yaptığımız çalışmada aynı N-glikan grubuna dahil olmayan 5 farklı N-glikana ait değerlerin bir aradaki etkisinin kanserli-kontrol örneklerini birbirinden ayırabildiği sonucuna varılmıştır. Benzer çalışmalardan farklı olarak elde edilen veriler üzerinden bu ayırım, hiyerarşik kümeleme analizi ile sadece bu 5 yapıya ait

değerler üzerinden yapılarak ispatlanmıştır. Çalışmanın bir başka özgün yanı FFPE doku kesitleri üzerinde çalışılmış olmasıdır. Özellikle fukozilasyonun kanserli dokularda artış göstermesi serum örnekleri ile yapılan çalışmalarla uyumludur. Bu nedenle meme kanseri hastalarında fukozilasyonun serumda olduğu gibi tümör dokularında da artış gösterdiği söylenebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada invaziv duktal karsinom tanısı almış hastalarından alınan biyopsi örneklerinin kanserli ve sağlıklı olarak tanı konulan doku örneklerinin N-glikan profilleri MALDI-TOF-MS ve HPLC-FD cihazları kullanılarak glikomiks yaklaşımıyla analiz edilmiştir. MALDI-TOF-MS analizleri sonucu doku örneklerinde 47 adet N-glikozilasyon yapısı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda 16 adet N-glikan yapısında $p < 0.001$ seviyesinde anlamlı farklılık tespit edilmiştir. İleri düzey istatistiksel analizler sonucu 5 adet N-glikana ait değerlerin bir arada yüksek derece anlamlı bir farklılık ortaya koyduğu ve hiyerarşik kümeleme modelinde kanserli-kontrol numunelerini tam olarak birbirinden ayırabildiği görülmüştür.

Ayrıca N-glikan yapıları stereokimyasal ve moleküler özelliklerine göre 23 farklı grup altında toplanmış ve kanser örneklerindeki değişimleri incelenmiştir. 6 adet N-glikozilasyon grubunda $p < 0.001$ seviyesinde anlamlı bir farklılık olduğu görülmüş ve kanserle birlikte değişime uğradıkları tespit edilmiştir. Bunlardan;

- Tek antenli N-glikanlar (GG4),
- İki antenli N-glikanlar (GG5),
- Üç antenli N-glikanlar (GG6)

kanserli örneklerde kontrollere oranla anlamlı bir artış,

- Anten üzerinden galaktozilasyonu olan glikanlar (GG10),
- Simetrik iki antenli N-glikanlar (GG13),
- Simetrik iki antenli fukozlanmış glikanlar (GG15) gruplarında ise kanserli örneklerde kontrollere oranla bir azalma tespit edilmiştir.

N-glikan gruplarının tanı testlerinde kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla uygulanan ROC analizleri kanserli yapılardaki farklılığın tanı testleri seviyesinde olduğunu göstermiştir. Özellikle GG4 olarak kodladığımız tek antenli N-glikanlar

grubunda ROC eğrisi altında kalan 0.920'dir ve bu yöntemlerde "mükemmel" olarak tanımlanan sınıflandırma kategorisi içerisinde. Yöntemin duyarlılığı %88.0 ve özgünlüğü %90.9 seviyesinde bulunmuştur.

Çalışmanın devamında etiketli N-glikan numuneleri HPLC-FD yöntemi ile analiz edilmişler ve 18 kromatografik bölge elde edilen sinyallere ait fraksiyonlar HPLC sisteminden alınarak MALDI-TOF-MS ile analiz edilmişlerdir. Bu sayede 24 farklı N-glikanın alıkonma zamanı bölgeleri tespit edilmiştir.

Meme kanseri biyobelirteci olarak onaylanan biyomoleküllerin analiz sırasındaki tekrarlanabilirlik problemi ve N-glikozilasyonun kanserli örneklerde farklılık gösterdiğinin tespit edilmesi ile meme kanseri örneklerinde glikomiks araştırmaları bilim dünyasının popüler konularından biri haline gelmiştir. Henüz hiçbir N-glikan yapısının tek başına biyobelirteç olarak onaylanmaması birden fazla N-glikan değerinin bir biyobelirteç grubu olarak değerlendirilmesi fikrini güçlendirmektedir. Çalışma sonucu elde ettiğimiz verilere göre tek antenli N-glikanların toplu halde değerlendirildiği grubun meme doku örneklerinde bir biyobelirteç potansiyeli taşıdığı söylenebilir. Diğer beş N-glikan grubunda tanı testleri için yeterli seviyede olmamasına rağmen kanserle güçlü bir ilişkilerinin olduğu açıktır. Ayrıca G9 (H7N2), G23 (H9N2), G27(H5N5F1), G35 (H5N5S2) ve G37 (H5N5F1S2) nolu N-glikan yapılarının tek başlarına ayrımsal bir gücü olmamasına rağmen bir arada değerlendirildiğinde kanser ve kontrol yapılarını eksiksiz bir biçimde birbirinden ayırabilecek bir sınıflandırma etkisi gösterdikleri görülmüştür. Elbette sonuçların doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından valide edilmeleri için daha büyük (n>1000) örneklem setleri üzerinde analiz edilmeleri ve klinik etkenlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

N-glikanlar yapılarının İDK tümör dokularındaki proteinlerde farklılık göstermelerinin nedeni halen gizemini korumaktadır. Çalışma sonuçlarının meme kanseri

tanısında kullanılabilir biyobelirteçlerin keşfi amacıyla yapılacak ileri seviye glikomiks çalışmaları için bir kilometre taşı olacağı kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

1. Ozmen V, Boylu S, Ok E, Canturk NZ, Celik V, Kapkac M, Girgin S, Tireli M, Ihtiyar E, Demircan O, Baskan MS, Koyuncu A, Tasdelen I, Dumanli E, Ozdener F, Zaborek P. Factors affecting breast cancer treatment delay in Turkey: a study from Turkish Federation of Breast Diseases Societies. *European Journal of Public Health*, 2015, 25: 9-14.
2. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature*, 2008, 452: 548-552.
3. Wulfschlegel JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nature reviews cancer*, 2003, 3: 267-275.
4. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, Ch'ang L-Y, Huang W, Liu B, Shen Y. The international HapMap project. *Nature*, 2003, 426: 789-796.
5. Ballman KV. Genetics and Genomics. *Circulation*, 2008, 118: 1593-1597.
6. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*, 2003, 422: 193-197.
7. Graveley BR. Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures. *Cell*, 2005, 123: 65-73.
8. Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2002, 66: 39-63.
9. Cline A, Bock R In *Translational control of gene expression*, Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1966; 321-333.
10. Simó C, Cifuentes A, García-Cañas V. *Fundamentals of advanced omics technologies: from genes to metabolites*. Baskı. Newnes, 2014.

11. Consortium U. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, 2017, 45: D158-D169.
12. Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology*, 2004, 8: 33-41.
13. Thaysen-Andersen M, Packer NH. Advances in LC-MS/MS-based glycoproteomics: getting closer to system-wide site-specific mapping of the N- and O-glycoproteome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2014, 1844: 1437-1452.
14. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 2003, 21: 255-261.
15. Nairn AV, Aoki K, dela Rosa M, Porterfield M, Lim J-M, Kulik M, Pierce JM, Wells L, Dalton S, Tiemeyer M. Regulation of Glycan Structures in Murine Embryonic Stem Cells Combined Transcript Profiling Of Glycan-Related Genes And Glycan Structural Analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287: 37835-37856.
16. Wormald MR, Petrescu AJ, Pao Y-L, Glithero A, Elliott T, Dwek RA. Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling. *Chemical Reviews*, 2002, 102: 371-386.
17. Rudd PM, Dwek RA. Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 1997, 32: 1-100.
18. Wiederschain GY. Essentials of glycobiology. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, 74: 1056-1056.
19. Walsh C. *Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory*. Baskl. Roberts and Company Publishers, 2006.

20. Lauc G, Wuhrer M. *High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics*. Baskı. Springer, 2017.
21. Kolarich D, Lepenies B, Seeberger PH. Glycomics, glycoproteomics and the immune system. *Current opinion in chemical biology*, 2012, 16: 214-220.
22. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends in biochemical sciences*, 2010, 35: 74-82.
23. Trombetta ES. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology*, 2003, 13: 77R-91R.
24. Varki A, Lowe JB. Biological roles of glycans. 2009.
25. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M, Dennis JW. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell*, 2007, 129: 123-134.
26. Abbott KL, Nairn AV, Hall EM, Horton MB, McDonald JF, Moremen KW, Dinulescu DM, Pierce M. Focused glycomic analysis of the N-linked glycan biosynthetic pathway in ovarian cancer. *Proteomics*, 2008, 8: 3210-3220.
27. Chillemi S. *Breast Cancer: Questions, Answers & Self-Help Techniques*. Baskı. Lulu.com, 2010.
28. McGuire S. World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2016, 7: 418-419.
29. Barnes BB, Steindorf K, Hein R, Flesch-Janys D, Chang-Claude J. Population attributable risk of invasive postmenopausal breast cancer and breast cancer subtypes for modifiable and non-modifiable risk factors. *Cancer epidemiology*, 2011, 35: 345-352.
30. Lakhani SR. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. Baskı. International Agency for Research on Cancer, 2012.

31. Wellings S, Jensen H, Marcum R. An Atlas of Subgross Pathology of the Human Breast With Special Reference to Possible Precancerous Lesions 2. *Journal of the National Cancer Institute*, 1975, 55: 231-273.
32. Lakhani SR, Audretsch W, Cleton-Jensen A-M, Cutuli B, Ellis I, Eusebi V, Greco M, Houslton RS, Kuhl CK, Kurtz J. The management of lobular carcinoma in situ (LCIS). Is LCIS the same as ductal carcinoma in situ (DCIS)? *European Journal of Cancer*, 2006, 42: 2205-2211.
33. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100: 3983-3988.
34. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Human pathology*, 1992, 23: 655-662.
35. Borst MJ, Ingold JA. Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. *Surgery*, 1993, 114: 637-642.
36. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991, 19: 403-410.
37. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 1999, 31: 209-223.
38. Stewart B, Wild CP. World cancer report 2014. *Health*, 2017.
39. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clinical chemistry*, 2002, 48: 1296-1304.

40. Robotti E, Manfredi M, Marengo E. Biomarkers discovery through multivariate statistical methods: a review of recently developed methods and applications in proteomics. *J Proteomics Bioinform*, 2014, 3: 20.
41. Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. *BMB reports*, 2011, 44: 772-781.
42. Kohn EC, Azad N, Annunziata C, Dharmoon AS, Whiteley G. Proteomics as a tool for biomarker discovery. *Disease markers*, 2007, 23: 411-417.
43. Hammarström S In *The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues*, Seminars in cancer biology. Elsevier: 1999; 67-81.
44. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, 1989, 57: 327-334.
45. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen C. An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. *Jama*, 1993, 270: 943-947.
46. Thompson S, Turner G. Elevated levels of abnormally-fucosylated haptoglobins in cancer sera. *British journal of cancer*, 1987, 56: 605-610.
47. Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, Murata K, Ohigashi H, Yokoyama S, Eguchi H. Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *International journal of cancer*, 2006, 118: 2803-2808.
48. Shriver Z, Raguram S, Sasisekharan R. Glycomics: a pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3: 863-873.

49. Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4: 477-488.
50. Pagel O, Lorocho S, Sickmann A, Zahedi RP. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 2015, 12: 235-253.
51. Guo H, Abbott KL. Chapter Eight-Functional Impact of Tumor-Specific N-Linked Glycan Changes in Breast and Ovarian Cancers. *Advances in Cancer Research*, 2015, 126: 281-303.
52. Drake PM, Cho W, Li B, Prakobphol A, Johansen E, Anderson NL, Regnier FE, Gibson BW, Fisher SJ. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clinical chemistry*, 2010, 56: 223-236.
53. Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of clinical pathology*, 2010, 63: 322-329.
54. Dumić J In *Glycosylation changes in cancer*, Cropbsa-Ceepus Summer University on Tumors, multidisciplinary approach. 2004.
55. An HJ, Kronewitter SR, de Leoz MLA, Lebrilla CB. Glycomics and disease markers. *Current opinion in chemical biology*, 2009, 13: 601-607.
56. Vincenti DC, Murray GI. The proteomics of formalin-fixed wax-embedded tissue. *Clinical biochemistry*, 2013, 46: 546-551.
57. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1985, 33: 845-853.
58. Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, De Jong A, Meiring H, ten Hove J, Hennink WE, Crommelin DJ. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins reactions with model peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 6235-6243.

59. Metz B, Kersten GF, Baart GJ, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, van Steenbergen MJ, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin. *Bioconjugate chemistry*, 2006, 17: 815-822.
60. Shi S-R, Liu C, Balgley BM, Lee C, Taylor CR. Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006, 54: 739-743.
61. Addis MF, Tanca A, Pagnozzi D, Crobu S, Fanciulli G, Cossu-Rocca P, Uzzau S. Generation of high-quality protein extracts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics*, 2009, 9: 3815-3823.
62. Ergin B, Meding S, Langer R, Kap M, Viertler C, Schott C, Ferch U, Riegman P, Zatloukal K, Walch A. Proteomic analysis of PAXgene-fixed tissues. *Journal of proteome research*, 2010, 9: 5188-5196.
63. Wolff C, Schott C, Porschewski P, Reischauer B, Becker K-F. Successful protein extraction from over-fixed and long-term stored formalin-fixed tissues. *PloS one*, 2011, 6: e16353.
64. Fowler CB, Waybright TJ, Veenstra TD, O'Leary TJ, Mason JT. Pressure-assisted protein extraction: a novel method for recovering proteins from archival tissue for proteomic analysis. *Journal of proteome research*, 2012, 11: 2602-2608.
65. Jiang X, Jiang X, Feng S, Tian R, Ye M, Zou H. Development of efficient protein extraction methods for shotgun proteome analysis of formalin-fixed tissues. *Journal of proteome research*, 2007, 6: 1038-1047.
66. Gräntzdörffer I, Yumlu S, Gioeva Z, von Wasielewski R, Ebert MP, Röcken C. Comparison of different tissue sampling methods for protein extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. *Experimental and molecular pathology*,

2010, 88: 190-196.

67. Giusti L, Lucacchini A. Proteomic studies of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Expert Review of Proteomics*, 2013, 10: 165-177.

68. Mansour A, Chatila R, Bejjani N, Dagher C, Faour WH. A novel xylene-free deparaffinization method for the extraction of proteins from human derived formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) archival tissue blocks. *MethodsX*, 2014, 1: 90-95.

69. Kalantari N, Bayani M, Ghaffari T. Deparaffinization of formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks using hot water instead of xylene. *Analytical biochemistry*, 2016, 507: 71-73.

70. Palmer-Toy DE, Krastins B, Sarracino DA, Nadol JB, Merchant SN. Efficient method for the proteomic analysis of fixed and embedded tissues. *Journal of proteome research*, 2005, 4: 2404-2411.

71. Balgley BM, Guo T, Zhao K, Fang X, Tavassoli FA, Lee CS. Evaluation of archival time on shotgun proteomics of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Journal of proteome research*, 2009, 8: 917-925.

72. Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 2007, 41: 141-200.

73. Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1991, 39: 741-748.

74. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1997, 45: 327-343.

75. Patel T, Bruce J, Merry A, Bigge C, Wormald M, Parekh R, Jaques A. Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry*, 1993, 32: 679-693.
76. Morelle W, Guyétant R, Strecker G. Structural analysis of oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Rana dalmatina*. *Carbohydrate research*, 1998, 306: 435-443.
77. Makino Y, Omichi K, Kuraya N, Ogawa H, Nishimura H, Iwanaga S, Hase S. Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX. *The Journal of Biochemistry*, 2000, 128: 175-180.
78. Piller F, Piller V. Structural characterization of mucin-type O-linked oligosaccharides in *Glycobiology: A Practical Approach* (Fukuda, M. and Kobata, A., eds.) pp. 291-328. 1993.
79. Fiedler K, Simons K. The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell*, 1995, 81: 309-312.
80. Claude E, Angel PM, Drake RR, Olivos H, Langridge JI. Ion mobility separation of N-Glycans directly from ffpe colon cancer tissue section in a MALDI imaging experiment. 2017.
81. Segu ZM, Hussein A, Novotny MV, Mechref Y. Assigning N-glycosylation sites of glycoproteins using LC/MSMS in conjunction with endo-M/exoglycosidase mixture. *Journal of proteome research*, 2010, 9: 3598-3607.
82. Budnik BA, Lee RS, Steen JA. Global methods for protein glycosylation analysis by mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2006, 1764: 1870-1880.

83. Ruhaak L, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder A, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, 397: 3457-3481.
84. You J, Sheng X, Ding C, Sun Z, Suo Y, Wang H, Li Y. Detection of carbohydrates using new labeling reagent 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone by capillary zone electrophoresis with absorbance (UV). *analytica chimica acta*, 2008, 609: 66-75.
85. Leteux C, Childs RA, Chai W, Stoll MS, Kogelberg H, Feizi T. Biotinyl-L-3-(2-naphthyl)-alanine hydrazide derivatives of N-glycans: versatile solid-phase probes for carbohydrate-recognition studies. *Glycobiology*, 1998, 8: 227-236.
86. Guillard M, Gloerich J, Wessels HJ, Morava E, Wevers RA, Lefeber DJ. Automated measurement of permethylated serum N-glycans by MALDI-linear ion trap mass spectrometry. *Carbohydrate research*, 2009, 344: 1550-1557.
87. Prien JM, Ashline DJ, Lapadula AJ, Zhang H, Reinhold VN. The high mannose glycans from bovine ribonuclease B isomer characterization by ion trap MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20: 539-556.
88. Cummings RD, Pierce JM. *Handbook of glycomics*. Baskl. Academic Press, 2009.
89. Kronewitter SR, De Leoz MLA, Peacock KS, McBride KR, An HJ, Miyamoto S, Leiserowitz GS, Lebrilla CB. Human serum processing and analysis methods for rapid and reproducible N-glycan mass profiling. *Journal of proteome research*, 2010, 9: 4952-4959.
90. Pabst M, Altmann F. Glycan analysis by modern instrumental methods. *Proteomics*, 2011, 11: 631-643.
91. Bruggink C, Maurer R, Herrmann H, Cavalli S, Hoefler F. Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1085: 104-109.

92. Pabst M, Kolarich D, Pörtl G, Dalik T, Lubec G, Hofinger A, Altmann F. Comparison of fluorescent labels for oligosaccharides and introduction of a new postlabeling purification method. *Analytical biochemistry*, 2009, 384: 263-273.
93. Wuhrer M, de Boer AR, Deelder AM. Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009, 28: 192-206.
94. Davies MJ, Smith KD, Carruthers RA, Chai W, Lawson AM, Hounsell EF. Use of a porous graphitised carbon column for the high-performance liquid chromatography of oligosaccharides, alditols and glycopeptides with subsequent mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1993, 646: 317-326.
95. Bynum MA, Yin H, Felts K, Lee YM, Monell CR, Killeen K. Characterization of IgG N-glycans employing a microfluidic chip that integrates glycan cleavage, sample purification, LC separation, and MS detection. *Analytical chemistry*, 2009, 81: 8818-8825.
96. Estrella RP, Whitelock JM, Packer NH, Karlsson NG. Graphitized Carbon LC-MS Characterization of the Chondroitin Sulfate Oligosaccharides of Aggrecan. *Analytical chemistry*, 2007, 79: 3597-3606.
97. Nakano M, Higo D, Arai E, Nakagawa T, Takehi K, Taniguchi N, Kondo A. Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry for rapid and sensitive N-glycan analysis of glycoproteins as 9-fluorenylmethyl derivatives. *Glycobiology*, 2008, 19: 135-143.
98. Vakhrushev SY, Langridge J, Campuzano I, Hughes C, Peter-Katalinić J. Ion mobility mass spectrometry analysis of human glycourinome. *Analytical chemistry*, 2008, 80: 2506-2513.

99. Valeur B, Berberan-Santos MN. *Molecular fluorescence: principles and applications*. Baski. John Wiley & Sons, 2012.
100. Ito AS, Turchiello RDF, Hirata IY, Cezari MHS, Meldal M, Juliano L. Fluorescent properties of amino acids labeled with ortho-aminobenzoic acid. *Biospectroscopy*, 1998, 4: 395-402.
101. Zenobi R, Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 1998, 17: 337-366.
102. Wuhrer M. Glycomics using mass spectrometry. *Glycoconjugate journal*, 2013, 30: 11-22.
103. Mechref Y, Novotny MV. High-Sensitivity Analytical Approaches to the Analysis of N-Glycans. *Handbook of Glycomics*, 2009: 1.
104. Handerson T, Camp R, Harigopal M, Rimm D, Pawelek J. β 1, 6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. *Clinical cancer research*, 2005, 11: 2969-2973.
105. Madjd Z, Parsons T, Watson NF, Spendlove I, Ellis I, Durrant LG. High expression of Lewis y/b antigens is associated with decreased survival in lymph node negative breast carcinomas. *Breast Cancer Research*, 2005, 7: R780.
106. Nakagoe T, Fukushima K, Itoyanagi N, Ikuta Y, Oka T, Nagayasu T, Ayabe H, Hara S, Ishikawa H, Minami H. Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 2002, 128: 257-264.
107. Hakomori S-I, Wang S-M, Young W. Isoantigenic expression of Forssman glycolipid in human gastric and colonic mucosa: its possible identity with "A-like antigen" in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74: 3023-3027.

108. Dennis JW, Laferte S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS. 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science*, 1987, 236: 582-585.
109. Dennis J, Laferte S. Oncodevelopmental expression of—GlcNAc β 1–6Man α 1–6Man β 1—branched asparagine-linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas. *Cancer Research*, 1989, 49: 945-950.
110. Potapenko IO, Haakensen VD, Lüders T, Helland Å, Bukholm I, Sørli T, Kristensen VN, Lingjærde OC, Børresen-Dale A-L. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular oncology*, 2010, 4: 98-118.
111. Burchell J, Poulsom R, Hanby A, Whitehouse C, Cooper L, Clausen H, Miles D, Taylor-Papadimitriou J. An α 2, 3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. *Glycobiology*, 1999, 9: 1307-1311.
112. Recchi M-A, Hebbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat J-P, Delannoy P. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer research*, 1998, 58: 4066-4070.
113. Wu C, Guo X, Wang W, Wang Y, Shan Y, Zhang B, Song W, Ma S, Ge J, Deng H. N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a potential biomarker for breast cancer by immunohistochemistry. *BMC cancer*, 2010, 10: 123.
114. Huang HL, Stasyk T, Morandell S, Dieplinger H, Falkensammer G, Griesmacher A, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, Huck CW. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis*, 2006, 27: 1641-1650.

115. Kirmiz C, Li B, An HJ, Clowers BH, Chew HK, Lam KS, Ferrige A, Alecio R, Borowsky AD, Sulaimon S. A serum glycomics approach to breast cancer biomarkers. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6: 43-55.
116. Kyselova Z, Mechref Y, Kang P, Goetz JA, Dobrolecki LE, Sledge GW, Schnaper L, Hickey RJ, Malkas LH, Novotny MV. Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. *Clinical chemistry*, 2008, 54: 1166-1175.
117. Alley Jr WR, Madera M, Mechref Y, Novotny MV. Chip-based reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of permethylated N-linked glycans: a potential methodology for cancer-biomarker discovery. *Analytical chemistry*, 2010, 82: 5095-5106.
118. De Leoz MLA, Young LJ, An HJ, Kronewitter SR, Kim J, Miyamoto S, Borowsky AD, Chew HK, Lebrilla CB. High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10: M110. 002717.
119. An HJ, Gip P, Kim J, Wu S, Park KW, McVaugh CT, Schaffer DV, Bertozzi CR, Lebrilla CB. Extensive determination of glycan heterogeneity reveals an unusual abundance of high mannose glycans in enriched plasma membranes of human embryonic stem cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11: M111. 010660.
120. Abbott KL, Aoki K, Lim J-M, Porterfield M, Johnson R, O'Regan RM, Wells L, Tiemeyer M, Pierce M. Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma. *Journal of proteome research*, 2008, 7: 1470-1480.
121. Abd Hamid UM, Royle L, Saldova R, Radcliffe CM, Harvey DJ, Storr SJ, Pardo M, Antrobus R, Chapman CJ, Zitzmann N. A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression. *Glycobiology*, 2008, 18: 1105-1118.

122. Saldova R, Asadi Shehni A, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I, Helland Å, Yakhini Z, Børresen-Dale A-L, Rudd PM. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *Journal of proteome research*, 2014, 13: 2314-2327.
123. Melmer M, Stangler T, Schiefermeier M, Brunner W, Toll H, Rupprechter A, Lindner W, Premstaller A. HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, 398: 905-914.
124. Knezevic A, Polasek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wright A, Kolcic I, O'Donoghue N, Bones J. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *Journal of proteome research*, 2008, 8: 694-701.
125. Arnold JN, Saldova R, Galligan MC, Murphy TB, Mimura-Kimura Y, Telford JE, Godwin AK, Rudd PM. Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer. *Journal of proteome research*, 2011, 10: 1755-1764.
126. Royle L, Campbell MP, Radcliffe CM, White DM, Harvey DJ, Abrahams JL, Kim Y-G, Henry GW, Shadick NA, Weinblatt ME. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Analytical biochemistry*, 2008, 376: 1-12.
127. Ruhaak LR, Uh H-W, Beekman M, Hokke CH, Westendorp RG, Houwing-Duistermaat J, Wuhrer M, Deelder AM, Slagboom PE. Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *Journal of proteome research*, 2011, 10: 1667-1674.
128. Stanta JL, Saldova R, Struwe WB, Byrne JC, Leweke FM, Rothermund M, Rahmoune H, Levin Y, Guest PC, Bahn S. Identification of N-glycosylation changes in

the CSF and serum in patients with schizophrenia. *Journal of proteome research*, 2010, 9: 4476-4489.

129. Rodriguez-Baena DS, Perez-Pulido AJ, Aguilar Ruiz JS. A biclustering algorithm for extracting bit-patterns from binary datasets. *Bioinformatics*, 2011, 27: 2738-2745.

130. Pepe MS, Feng Z, Janes H, Bossuyt PM, Potter JD. Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *Journal of the National Cancer Institute*, 2008, 100: 1432-1438.

131. Liu Z, Jiang F, Tian G, Wang S, Sato F, Meltzer SJ, Tan M. Sparse logistic regression with Lp penalty for biomarker identification. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 2007, 6.

132. Qu Y, Adam B-L, Yasui Y, Ward MD, Cazares LH, Schellhammer PF, Feng Z, Semmes OJ, Wright GL. Boosted decision tree analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients. *Clinical Chemistry*, 2002, 48: 1835-1843.

133. Ma S, Huang J. Regularized ROC method for disease classification and biomarker selection with microarray data. *Bioinformatics*, 2005, 21: 4356-4362.

134. Metz CE. Receiver operating characteristic analysis: a tool for the quantitative evaluation of observer performance and imaging systems. *Journal of the American College of Radiology*, 2006, 3: 413-422.

135. Hart PD. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis: A tutorial using body mass index (BMI) as a measure of obesity. *J. Phys. Act. Res*, 2016, 1: 5-8.

136. Mercaldo ND, Lau KF, Zhou XH. Confidence intervals for predictive values with an emphasis to case-control studies. *Statistics in Medicine*, 2007, 26: 2170-2183.

137. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, Müller M. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 77.
138. Toloşı L, Lengauer T. Classification with correlated features: unreliability of feature ranking and solutions. *Bioinformatics*, 2011, 27: 1986-1994.
139. Myers L, Sirois MJ. Spearman correlation coefficients, differences between. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 2006.
140. Büyüköztürk Ş. Faktör analizi: Temel kavramlar ve ölçek geliştirmede kullanımı. *Kuram ve uygulamada eğitim yönetimi*, 2002, 32: 470-483.
141. Jolliffe IT. Discarding variables in a principal component analysis. II: Real data. *Applied statistics*, 1973: 21-31.
142. YAZAR I, YAVUZ HS, ÇAY MA. Temel Bileşen Analizi Yönteminin ve Bazı Klasik ve Robust Uyarlamalarının Yüz Tanıma Uygulamaları. 2017.
143. Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the lasso. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1996: 267-288.
144. Li X, Zhao T, Yuan X, Liu H. An R package flare for high dimensional linear regression and precision matrix estimation. *R Package Vigette*, 2012.
145. Steinbach M, Karypis G, Kumar V In *A comparison of document clustering techniques*, KDD workshop on text mining,. Boston: 2000; 525-526.
146. Sarıman G. Veri madenciliğinde kümeleme teknikleri üzerine bir çalışma: k-means ve k-medoids kümeleme algoritmalarının karşılaştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2011, 15.
147. Fox J, Weisberg S, Adler D, Bates D, Baud-Bovy G, Ellison S, Firth D, Friendly M, Gorjanc G, Graves S. Package ‘car’. 2017.

148. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics*, 2005, 21: 3940-3941.
149. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara R, Simpson GL, Solymos P, Stevens M, Wagner H. Package 'vegan'. *Community ecology package, version*, 2013, 2.
150. Wickham H. ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2011, 3: 180-185.
151. Bock C, Coleman M, Collins B, Davis J, Foulds G, Gold L, Greef C, Heil J, Heilig JS, Hicke B. Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis. *Proteomics*, 2004, 4: 609-618.
152. MacNeil J. Better biomarkers for the diagnostics labyrinth. *Genome Technol*, 2004, 15: 24-33.
153. Fowler CB, Waybright TJ, Veenstra TD, O'Leary TJ, Mason JT. Pressure-assisted protein extraction: a novel method for recovering proteins from archival tissue for proteomic analysis. *Journal of proteome research*, 2012, 11: 2602.
154. Wang T, Cai ZP, Gu XQ, Ma HY, Du YM, Huang K, Voglmeir J, Liu L. Discovery and characterization of a novel extremely acidic bacterial N-glycanase with combined advantages of PNGase F and A. *Bioscience reports*, 2014, 34: e00149.
155. Kita Y, Miura Y, Furukawa J-i, Nakano M, Shinohara Y, Ohno M, Takimoto A, Nishimura S-I. Quantitative glycomics of human whole serum glycoproteins based on the standardized protocol for liberating N-glycans. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6: 1437-1445.
156. Banazadeh A, Veillon L, Wooding KM, Zabet-moghaddam M, Mechref Y. Recent advances in mass spectrometric analysis of glycoproteins. *Electrophoresis*, 2017, 38: 162-189.

157. Ongay S, Boichenko A, Govorukhina N, Bischoff R. Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *Journal of separation science*, 2012, 35: 2341-2372.
158. Tranmer M, Elliot M. Multiple linear regression. *The Cathie Marsh Centre for Census and Survey Research (CCSR)*, 2008.
159. Theodoratou E, Thaçi K, Agakov F, Timofeeva MN, Štambuk J, Pučić-Baković M, Vučković F, Orchard P, Agakova A, Din FV. Glycosylation of plasma IgG in colorectal cancer prognosis. *Scientific reports*, 2016, 6: 28098.
160. Kronewitter SR, De Leoz MLA, Strum JS, An HJ, Dimapasoc LM, Guerrero A, Miyamoto S, Lebrilla CB, Leiserowitz GS. The glycolyzer: automated glycan annotation software for high performance mass spectrometry and its application to ovarian cancer glycan biomarker discovery. *Proteomics*, 2012, 12: 2523-2538.
161. Saldova R, Reuben J, Abd Hamid U, Rudd P, Cristofanilli M. Levels of specific serum N-glycans identify breast cancer patients with higher circulating tumor cell counts. *Annals of oncology*, 2010, 22: 1113-1119.
162. Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbe H, Hayward C, Wright A, Kolčić I, O'donoghue N, Bones J. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *Journal of proteome research*, 2009, 8: 694-701.
163. Ferlay J, Parkin D, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European journal of cancer*, 2010, 46: 765-781.
164. Duffy MJ. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clinical chemistry*, 2006, 52: 345-351.
165. Mechref Y, Hu Y, Garcia A, Hussein A. Identifying cancer biomarkers by mass spectrometry-based glycomics. *Electrophoresis*, 2012, 33: 1755-1767






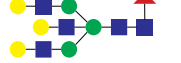
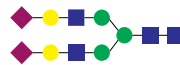
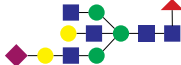

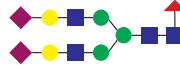
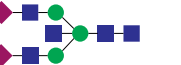






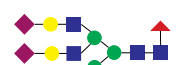




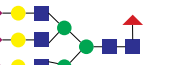
EKLER

EK 1. ÇİZELGELER

EK 1-A: Meme kanseri doku örneklerinde tespit edilen N-glikanlara ait özellikleri

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
N-Glikan Adı	H5N2	H3N3F1	H3N4	H6N2	H3N3S1	H3N4F1
Yapısı						
Teorik Kütle	1354.4789	1379.5106	1436.532	1516.5317	1524.5481	1582.5899
	G7	G8	G9	G10	G11	G12
N-Glikan Adı	H4N4	H3N5	H7N2	H4N3S1	H6N3	H4N4F1
Yapısı						
Teorik Kütle	1598.5848	1639.6114	1678.5846	1686.6009	1719.6111	1744.6428
	G13	G14	G15	G16	G17	G18
N-Glikan Adı	H5N4	H3N5F1	H4N5	H4N3F1S1	H8N2	H5N3S1
Yapısı						
Teorik Kütle	1760.6377	1785.6693	1801.6642	1832.6588	1840.6374	1848.6537
	G19	G20	G21	G22	G23	G24
N-Glikan Adı	H4N4S1	H5N4F1	H4N5F1	H5N5	H9N2	H6N3S1
Yapısı						
Teorik Kütle	1889.6803	1906.6956	1947.7221	1963.717	2002.6902	2010.7065

EK 1-A'nın devamı

	G25	G26	G27	G28	G29	G30
N-Glikan Adı	H4N4F1S1	H5N4S1	H5N5F1	H5N4F1S1	H5N5S1	H6N5F1
Yapısı						
Teorik Kütle	2035.7382	2051.7331	2109.775	2197.791	2254.8125	2271.8278
	G31	G32	G33	G34	G35	G36
N-Glikan Adı	H5N4S2	H5N5F1S1	H6N5S1	H5N4F1S2	H5N5S2	H6N5F1S1
Yapısı						
Teorik Kütle	2342.8285	2400.8704	2416.8653	2488.8864	2545.9079	2562.9232
	G37	G38	G39	G40	G41	G42
N-Glikan Adı	H5N5F1S2	H6N5S2	H6N5F1S2	H10N6	H7N6S2	H6N5F1S3
Yapısı						
Teorik Kütle	2691.9658	2707.9607	2854.0186	2977.0655	3073.0929	3145.7382
	G43	G44	G45	G46	G47	G48
N-Glikan Adı	H7N6F1S2	H7N6S3	H7N6F1S3	H7N6S4	H7N6F1S4	
Yapısı						
Teorik Kütle	3219.1508	3416.8653	3488.8864	3545.9079	3655.2837	

EK 1-B: N-Glikan ve N-glikozilasyon grupları değerleri ile kanserli-kontrol grupları arasındaki t-testi sonuçları

N-Glikan ~ Kanser Durumu							N-Glikan ~ Kanser Durumu						
		Ortalama (Kanser- Kontrol)		Varyans (t-değeri)	Serbestlik derecesi	p değeri			Ortalama (Kanser- Kontrol)	Varyans (t- değeri)	Serbestlik derecesi	p değeri	
G1	H5N2	2.228	0.939	-5.824	33.99	1.457e-06	G22	H5N5	0.674	0.755	1.387	20.20	0.1805
G2	H3N3F1	1.159	0.720	-4.069	28.06	0.00034	G23	H9N2	1.643	3.102	5.309	23316	0.0002
G3	H3N4	0.647	0.585	-0.654	13.09	0.5242	G24	H6N3S1	0.967	1.091	1.793	13.52	0.0952
G4	H6N2	2.397	1.129	-6.421	32.49	3.012e-07	G25	H4N4F1S1	1.928	1.660	-2.973	33.11	0.0056
G5	H3N3S1	1.016	0.830	-2.403	19.37	0.0264	G26	H5N4S1	6.255	5.194	-2.910	43455	0.0083
G6	H3N4F1	2.314	1.034	-4.489	26.96	0.0001	G27	H5N5F1	1.879	3.893	4.140	13850	0.001
G7	H4N4	0.890	0.750	-1.668	18.78	0.119	G28	H5N4F1S1	15.212	15.722	0.632	43117	0.5358
G8	H3N5	0.876	0.547	-2.597	31.32	0.0141	G29	H5N5S1	0.892	1121	3.465	18.83	0.0026
G9	H7N2	1.923	1.056	-7.112	33.80	3.332e-08	G30	H6N5F1	1.146	1.405	3.379	43366	0.0025
G10	H4N3S1	1.839	1.258	5.798	23.62	5.943e-06	G31	H5N4S2	9.571	9.332	-0.239	32.59	0.8124
G11	H6N3	0.746	0.644	-1.794	21.44	0.0867	G32	H5N5F1S1	1.818	3.229	5.851	30256	8.304e-05
G12	H4N4F1	2.691	1.873	-4.038	43403	0.00034	G33	H6N5S1	0.847	1.066	3.566	22.67	0.0016
G13	H5N4	1.729	1.377	-2.934	32.62	0.0060	G34	H5N4F1S2	7.621	8.100	0.700	31.85	0.4887
G14	H3N5F1	1.401	0.854	-3.331	32.61	0.0021	G35	H5N5S2	0.650	0.972	6.953	27.17	1.73e-07
G15	H4N5	0.823	0.706	-1.189	16.96	0.2505	G36	H6N5F1S1	2.218	3.375	4.738	27.60	5.851e-05
G16	H4N3F1S1	2.260	1.521	-5.197	33.84	9.641e-06	G37	H5N5F1S2	0.886	1.335	4.561	31.64	7.219e-05
G17	H8N2	1.850	1.594	-1.844	21.90	0.0786	G38	H6N5S2	0.933	1.081	1.369	27.41	0.182
G18	H5N3S1	1.001	0.835	-2.677	20.42	0.0143	G39	H6N5F1S2	1.515	2.419	4.086	25.52	0.0003
G19	H4N4S1	1.110	0.921	-2.994	22.67	0.0065	G40	H6N5S3	1.174	1.345	0.960	33.74	0.3436
G20	H5N4F1	7.459	6.556	-1.514	33.77	0.1392	G41	H7N6S2	0.449	0.586	2.411	19.90	0.0256
G21	H4N5F1	2.094	2.208	0.434	32.74	0.6671	G42	H6N5F1S3	0.870	1.445	3.614	22.35	0.0015

EK 1.-B'nin devamı

N-Glikan ~ Kanser Durumu							N-Glikan ~ Kanser Durumu						
		Ortalama (Kanser- Kontrol)	Varyans (t-değeri)	Serbestlik derecesi	p değeri			Ortalama (Kanser-Kontrol)	Varyans (t-değeri)	Serbestli k derecesi	p değeri		
G43	H7N6F1S2	0.775	1.423	4.266	20.32	0.0003	G46	H7N6S4	0.461	0.712	2.135	15.78	0.0487
G44	H7N6S3	0.401	0.535	1.708	15.54	0.1075	G47	H7N6F1S4	0.328	0.485	2.192	13.95	0.0458
G45	H7N6F1S3	0.413	0.659	3.144	17.58	0.0057							

N-Glikozilasyon gruplarına ait t-testi sonuçları

N-Glikozilasyon grubu ~ Kanser Durumu							N-Glikozilasyon grubu ~ Kanser Durumu						
		Ortalama (Kanser- Kontrol)	Varyans (t-değeri)	Serbestlik derecesi	p değeri			Ortalama (Kanser-Kontrol)	Varyans (t-değeri)	Serbestlik derecesi	p değeri		
GG1	M	10.042	7.801	-32.453	24.052	0.0034	GG13	A2B	15.359	20.834	3.863	16.516	0.00013
GG2	Hy	2.715	2.571	-9.173	17.758	0.3712	GG14	A2F0B	5.031	5.473	1.210	18.457	0.2415
GG3	C	90.612	92.409	2.685	25.126	0.0126	GG15	A2FB	16.733	20.087	4.372	23.551	0.00021
GG4	A1	6.276	4.331	-5.724	22.235	8.947e-06	GG16	A2S	50.576	52.256	0.914	33.673	0.3672
GG5	A2	79.940	74.358	-5.0275	31.522	1.904e-05	GG17	A3S	13.445	17.097	3.159	28.789	0.0036
GG6	A3	7.532	10.796	4.831	29.035	4.043e-05	GG18	A4S	1.497	2.167	3.229	18.713	0.0044
GG7	A4	2.367	3.691	3.327	18.151	0.0037	GG19	A2F0S	21.074	20.533	-0.372	32.799	0.7122
GG8	B	11.998	15.627	3.220	18.953	0.0045	GG20	A3F0S	26.789	22.641	-2.021	29.755	0.0522
GG9	F	55.996	59.938	3.160	23.94	0.0042	GG21	A2FS	24.731	27.358	2.093	29.855	0.0448
GG10	AG	66.096	71.173	3.997	23.597	0.00054	GG22	A3FS	33.448	38.529	3.419	28.653	0.0019
GG11	A2F	62.975	65.030	1.401	31.574	0.1709	GG23	IGG	17.840	16.423	-0.958	33.97	0.3446
GG12	A3F	65.214	66.647	1.104	28.298	0.2785							

EK 1-C: Her bir numuneye ait N-Glikan grup miktarları ile kanserli-kontrol grupları ve nükleer grade seviyeleri arasındaki Kruskal-

Wallis testi sonuçları

	W değeri	P değeri		W değeri	P değeri		W değeri	P değeri		W değeri	P değeri
G1	60	0.877	G16	53	0.8284	G31	34	0.1561	G46	72	0.366
G2	65	0.6419	G17	55	0.926	G32	62	0.7805	G47	78	0.1978
G3	66	0.598	G18	78	0.1978	G33	58	0.9753			
G4	47	0.5553	G19	25	0.04278	G34	67	0.5553			
G5	34	0.1561	G20	62	0.7805	G35	61	0.8284			
G6	42	0.366	G21	54	0.877	G36	57	1			
G7	50	0.687	G22	66	0.598	G37	62	0.7805			
G8	71	0.4004	G23	56	0.9753	G38	62	0.7805			
G9	50	0.687	G24	60	0.877	G39	68	0.5142			
G10	29	0.07998	G25	38	0.2465	G40	58	0.9753			
G11	85	0.07998	G26	19	0.0139	G41	77	0.2212			
G12	58	0.9753	G27	56	0.9753	G42	65	0.6419			
G13	58	0.9753	G28	66	0.598	G43	68	0.5142			
G14	53	0.8284	G29	56	0.9753	G44	67	0.5553			
G15	68	0.5142	G30	75	0.2736	G45	67	0.5553			
	W değeri	P değeri		W değeri	P değeri		W değeri	P değeri		W değeri	P değeri
GG1	52	0.7805	GG7	69	0.4746	GG13	62	0.7805	GG19	31	0.106
GG2	80	0.1561	GG8	62	0.7805	GG14	78	0.1978	GG20	35	0.176
GG3	50	0.687	GG9	96	0.0112	GG15	80	0.1561	GG21	72	0.366
GG4	51	0.7333	GG10	55	0.926	GG16	54	0.877	GG22	62	0.7805
GG5	54	0.877	GG11	93	0.0207	GG17	62	0.7805	GG23	57	1
GG6	72	0.366	GG12	74	0.3025	GG18	70	0.4367			

EK 1-D: Spearman korelasyon yöntemi ile 16 N-glikan değişkeni arasında elde edilen regresyon katsayısı (r) değerleri

Hasalık																	
Durumu	G1	G2	G4	G6	G9	G10	G12	G16	G23	G27	G32	G35	G36	G37	G39	G43	
Hastalık Durumu	1.00	0.66	0.61	0.69	0.54	0.73	0.68	0.37	0.71	-0.73	-0.64	-0.74	-0.73	-0.61	-0.50	-0.54	-0.57
G1	0.66	1.00	0.88	0.96	0.84	0.84	0.73	0.80	0.76	-0.77	-0.13	-0.62	-0.75	-0.86	-0.80	-0.84	-0.84
G2	0.61	0.88	1.00	0.89	0.82	0.79	0.70	0.67	0.72	-0.68	-0.16	-0.56	-0.64	-0.75	-0.71	-0.78	-0.70
G4	0.69	0.96	0.89	1.00	0.85	0.90	0.76	0.74	0.79	-0.74	-0.19	-0.67	-0.77	-0.85	-0.76	-0.85	-0.84
G6	0.54	0.84	0.82	0.85	1.00	0.66	0.63	0.82	0.52	-0.71	0.04	-0.39	-0.67	-0.81	-0.60	-0.87	-0.84
G9	0.73	0.84	0.79	0.90	0.66	1.00	0.68	0.48	0.80	-0.57	-0.44	-0.75	-0.63	-0.71	-0.61	-0.65	-0.65
G10	0.68	0.73	0.70	0.76	0.63	0.68	1.00	0.46	0.73	-0.69	-0.32	-0.58	-0.69	-0.64	-0.57	-0.72	-0.70
G12	0.37	0.80	0.67	0.74	0.82	0.48	0.46	1.00	0.41	-0.74	0.25	-0.32	-0.63	-0.77	-0.68	-0.80	-0.80
G16	0.71	0.76	0.72	0.79	0.52	0.80	0.73	0.41	1.00	-0.59	-0.38	-0.78	-0.76	-0.55	-0.76	-0.54	-0.66
G23	-0.73	-0.77	-0.68	-0.74	-0.71	-0.57	-0.69	-0.74	-0.59	1.00	0.19	0.57	0.77	0.75	0.72	0.74	0.75
G27	-0.64	-0.13	-0.16	-0.19	0.04	-0.44	-0.32	0.25	-0.38	0.19	1.00	0.62	0.18	0.01	-0.01	-0.09	-0.09
G32	-0.74	-0.62	-0.56	-0.67	-0.39	-0.75	-0.58	-0.32	-0.78	0.57	0.62	1.00	0.60	0.53	0.64	0.42	0.47
G35	-0.73	-0.75	-0.64	-0.77	-0.67	-0.63	-0.69	-0.63	-0.76	0.77	0.18	0.60	1.00	0.65	0.74	0.72	0.78
G36	-0.61	-0.86	-0.75	-0.85	-0.81	-0.71	-0.64	-0.77	-0.55	0.75	0.01	0.53	0.65	1.00	0.68	0.89	0.85
G37	-0.50	-0.80	-0.71	-0.76	-0.60	-0.61	-0.57	-0.68	-0.76	0.72	-0.01	0.64	0.74	0.68	1.00	0.70	0.76
G39	-0.54	-0.84	-0.78	-0.85	-0.87	-0.65	-0.72	-0.80	-0.54	0.74	-0.09	0.42	0.72	0.89	0.70	1.00	0.93
G43	-0.57	-0.84	-0.70	-0.84	-0.84	-0.65	-0.70	-0.80	-0.66	0.75	-0.09	0.47	0.78	0.85	0.76	0.93	1.00

EK 1-E: N-glikan grupları ve grupların bağıl bolluk değerlerinin hesaplanması

N-Glikan Grubu	N-glikan Kodu	Hesaplama
Oligomannozik glikanlar	GG1	$(H5N2 + H6N2 + H7N2 + H8N2 + H9N2) / T.$
Hibrit glikanlar	GG2	$(H6N3 + H5N3S1 + H6N3S1).$
Kompleks glikanlar	GG3	$(H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H6N5F1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H6N5S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H6N5F1S1 + H5N5F1S2 + H6N5S2 + H6N5F1S2 + H6N5S3 + H10N6 + H7N6S2 + H6N5F1S3 + H7N6F1S2 + H7N6S3 + H7N6F1S3 + H7N6S4 + H7N6F1S4 + H7N6F2S4) / T.$
Tek antenli glikanlar	GG4	$(H3N3F1 + H3N3S1 + H4N3S1 + H4N3F1S1) / T.$
İki antenli glikanlar	GG5	$(H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2) / T.$
Üç antenli glikanlar	GG6	$(H6N5F1 + H6N5S1 + H6N5F1S1 + H6N5S2 + H6N5F1S2 + H6N5S3 + H6N5F1S3) / T.$
Dört antenli glikanlar	GG7	$(H10N6 + H7N6S2 + H7N6F1S2 + H7N6S3 + H7N6F1S3 + H7N6S4 + H7N6F1S4 + H7N6F2S4) / T.$
Simetrik glikanlar	GG8	$(H3N5 + H3N5F1 + H4N5 + H4N5F1 + H5N5 + H5N5F1 + H5N5S1 + H5N5F1S1 + H5N5S2 + H5N5F1S2) / T.$
Fukozlanmış glikanlar	GG9	$(H3N3F1 + H3N4F1 + H4N4F1 + H3N5F1 + H4N3F1S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H4N4F1S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H6N5F1 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H6N5F1S1 + H5N5F1S2 + H6N5F1S2 + H6N5F1S3 + H7N6F1S2 + H7N6F1S3 + H7N6F1S4 + H7N6F2S4) / T.$

EK 1-E'nin devamı

N-Glikan Grubu	N-glikan Kodu	Hesaplama
Anten üzerinden galaktozilasyonu olan glikanlar	GG10	$\left(\frac{1}{2} * (H4N4 + H4N4F1 + H4N5 + H4N4S1 + H4N5F1 + H4N4F1S1) + \frac{2}{2} * (H5N4 + H5N4F1 + H5N5 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2) + \frac{3}{3} * (H6N5F1 + H6N5S1 + H6N5F1S1 + H6N5S2 + H6N5F1S2 + H6N5F1S2 + H6N5S3 + H6N5F1S3) + \frac{4}{4} * (H10N6 + H7N6S3 + H7N6F1S2 + H7N6F1S3 + H7N6S4 + H7N6F1S4 + H7N6F2S4) \right) / (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N4S1 + H4N5F1 + H5N5 + H5N4S1 + H4N4F1S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2 + H6N5S1 + H6N5F1S1 + H6N5S2 + H6N5F1S2 + H6N5S3 + H6N5F1S3 + H10N6 + H7N6F1S2 + H7N6S3 + H7N6F1S3 + H7N6S4 + H7N6F1S4 + H7N6F2S4)$
İki antenli yapı üzerinden fukozlanmış glikanlar	GG11	$\left(H3N3F1 + H3N4F1 + H4N4F1 + H3N5F1 + H4N3F1S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H4N4F1S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5F1S2 / H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2 \right)$
Üç antenli yapı üzerinden fukozlanmış glikanlar	GG12	$\left(H6N5F1 + H6N5F1S1 + H6N5F1S2 + H6N5F1S3 / (H6N5F1 + H6N5S1 + H6N5F1S1 + H6N5S2 + H6N5F1S2 + H6N5S3 + H6N5F1S3) \right)$
Simetrik iki antenli glikanlar	GG13	$\left(H3N5 + H3N5F1 + H4N5 + H4N5F1 + H5N5 + H5N5F1 + H5N5S1 + H5N5F1S1 + H5N5S2 + H5N5F1S2 / H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2 \right)$
Simetrik iki antenli fukozlanmamış glikanlar	GG14	$\left(H3N5 + H4N5 + H5N5 + H5N5S1 + H5N5S2 / H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2 \right)$

EK 1-E'nin devamı

N-Glikan Grubu	N-glikan Kodu	Hesaplama
Simetrik iki antenli fukozlanmış glikanlar	GG15	$(H3N5F1 + H4N5F1 + H5N5F1 + H5N5F1S1 + H5N5F1S2 / H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2)$
İki antenli siyalilasyona uğramış glikanlar	GG16	$1/2 * (H3N3S1 + H4N3S1 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N5F1S1) + 2/2 * (H5N4S2 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2) / (H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2)$
Üç antenli siyalilasyona uğramış glikanlar	GG17	$1/3 * (H6N5S1 + H6N5F1S1) + 2/3 * (H6N5S2 + H6N5F1S2) + 3/3 * (H6N5S3 + H6N5F1S3) / (H6N5F1 + H6N5S1 + H6N5F1S1 + H6N5S2 + H6N5F1S2 + H6N5S3 + H6N5F1S3).$
Dört antenli siyalilasyona uğramış glikanlar	GG18	$2/4 * (H7N6S2 + H7N6F1S2) + 3/4 * (H7N6S3 + H7N6F1S3) + 4/4 * (H7N6S4 + H7N6F1S4 + H7N6F2S4) / (H10N6 + H7N6S2 + H7N6F1S2 + H7N6S3 + H7N6F1S3 + H7N6S4 + H7N6F1S4 + H7N6F2S4).$
Siyalilasyona uğramış fukozlanma içermeyen iki antenli glikanlar	GG19	$1/2 * (H3N3S1 + H4N3S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4S1 + H5N5S1) + 2/2 * (H5N4S2 + H5N5S2) / (H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2)$
Siyalilasyona uğramış fukozlanma içermeyen üç antenli glikanlar	GG20	$1/3 * (H6N5S1) + 2/3 * (H6N5S2) + 3/3 * (H6N5S3) / (H6N5F1 + H6N5S1 + H6N5F1S1 + H6N5S2 + H6N5F1S2 + H6N5S3 + H6N5F1S3)$

EK 1-E'nin devamı

N-Glikan Grubu	N-glikan Kodu	Hesaplama
Siyalilasyona uğramış ve fukozlanmış iki antenli glikanlar	GG21	$\frac{1}{2} * (H4N3F1S1 + H4N4F1S1 + H5N4F1S1 + H5N5F1S1) + \frac{2}{2} * (H5N4F1S2 + H5N5F1S2) / (H3N4 + H3N3F1 + H3N3S1 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N3S1 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N3F1S1 + H5N3S1 + H4N4S1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H5N5 + H4N4F1S1 + H5N4S1 + H5N5F1 + H5N4F1S1 + H5N5S1 + H5N4S2 + H5N5F1S1 + H5N4F1S2 + H5N5S2 + H5N5F1S2)$
Siyalilasyona uğramış ve fukozlanmış üç antenli glikanlar	GG22	$\frac{1}{3} * (H6N5F1S1) + \frac{2}{3} * (H6N5F1S2) + \frac{3}{3} * (H6N5F1S3) / (H6N5F1 + H6N5S1 + H6N5F1S1 + H6N5S2 + H6N5F1S2 + H6N5S3 + H6N5F1S3).$
IgG'ye özgü glikan yapıları	GG23	$(H3N4F1 + H4N4F1 + H5N4F1 + H3N5F1 + H4N5F1 + H5N5F1)/T.$

EK 1-F. Temel bileşen analizi (PCA) sonucu elde edilen varyasyon katsayıları tablosu

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16
G1	0.293	-0.090	0.018	-0.037	0.019	-0.138	0.250	-0.046	0.328	-0.274	0.112	-0.394	0.329	-0.432	0.153	-0.390
G2	0.262	-0.018	0.307	0.052	0.245	-0.039	0.607	0.159	-0.275	0.437	-0.123	0.015	0.258	0.077	-0.120	0.101
G4	0.296	-0.066	0.230	0.062	0.158	-0.026	-0.025	0.073	0.198	-0.089	-0.007	0.043	-0.287	-0.153	0.579	0.575
G6	0.232	-0.233	0.038	0.313	0.409	0.478	-0.232	-0.276	-0.393	-0.197	0.130	-0.217	0.006	0.020	-0.079	-0.050
G9	0.263	0.102	0.486	0.184	0.097	0.014	-0.138	0.220	0.358	-0.193	0.146	0.412	-0.119	0.132	-0.346	-0.256
G10	0.249	0.162	-0.005	-0.088	-0.560	0.333	0.381	-0.011	-0.072	-0.325	0.212	-0.178	-0.158	0.246	-0.139	0.206
G12	0.250	-0.302	-0.279	0.068	0.095	-0.195	0.135	-0.245	0.265	-0.148	-0.599	-0.046	-0.210	0.276	-0.252	0.046
G16	0.213	0.273	0.333	-0.543	-0.031	0.094	-0.160	-0.595	-0.016	0.180	-0.181	0.047	-0.030	-0.029	0.050	-0.117
G23	-0.274	-0.255	0.569	-0.042	-0.185	-0.143	-0.218	0.220	-0.118	-0.126	-0.277	-0.502	0.028	0.239	0.039	-0.027
G27	-0.111	-0.594	0.078	-0.415	0.053	0.034	0.081	0.013	0.090	0.161	0.331	-0.035	-0.324	-0.257	-0.343	0.107
G32	-0.226	-0.423	0.062	-0.143	-0.008	0.282	0.203	-0.125	0.153	-0.146	0.034	0.374	0.333	0.377	0.391	-0.132
G35	-0.259	-0.051	0.252	0.295	-0.120	-0.426	0.248	-0.465	-0.290	-0.309	0.084	0.243	-0.087	-0.217	-0.047	0.060
G36	-0.259	0.197	0.019	-0.272	0.290	0.290	0.251	0.277	-0.162	-0.410	-0.393	0.111	-0.226	-0.294	-0.008	-0.117
G37	-0.256	-0.014	0.160	0.415	-0.259	0.473	0.078	-0.160	0.355	0.307	-0.266	-0.052	-0.007	-0.332	-0.082	0.054
G39	-0.272	0.236	0.050	-0.116	0.336	-0.002	-0.003	-0.145	0.307	-0.213	0.117	-0.163	0.413	0.097	-0.316	0.510
G43	-0.270	0.225	0.034	0.108	0.314	-0.034	0.285	-0.157	0.208	0.156	0.253	-0.311	-0.462	0.332	0.187	-0.267

EK 2. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
<p>Adı Soyadı: Mehmet Emrah YAMAN Doğum tarihi: 02.09.1982 Doğum yeri: Erzurum Medeni hali: Bekâr Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 236 5251 Faks: 0449 236 52 00 E-mail: emrahyaman@atauni.edu.tr</p>
Eğitim
<p>Lise: Erzurum Atatürk Lisesi (1999) Lisans: Karadeniz Teknik Üni. Fen Fak./Kimya Böl. (2003-2009) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2010-2012) Doktora: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2012-)</p>
Yabancı Dil Bilgisi
<p>İngilizce: Orta derecede (ÜDS 65.00, Ekim 2012)</p> <hr/> <hr/>
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
<p>Kimyagerler Derneği</p> <p>.....</p>
İlgi Alanları ve Hobiler
<p>Doğa yürüyüşü, Camping, Kayak, Kitap okumak (Yakın dünya tarihi, klasikler)</p>

EK 3. ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/3
Konu : Etik Kurul Kararı

04.01.2018

Sayın: Arş.Gör.Mehmet Emrah YAMAN
Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı
Araştırma Görevlisi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz "İnvaziv Duktal Karsinom Tanısı Almış Meme Dokusu Örneklerine Ait N-Bağlı Glikozilasyon Yapılarının Glikomiks Yaklaşımı İle Analizi Ve Biyobelirteç Potansiyellerinin Araştırılması" isimli bilimsel tez çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Eki _____ :
1 Adet Etik Kurul Kararı



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Arş.Gör.Dr.Mehmet Emrah YAMAN	
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI	İnvaziv Duktal Karsinom Tanısı Almış Meme Dokusu Örneklerine Ait N-Bağlı Glikozilasyon Yapılarının Glikomiks Yaklaşımı İle Analizi Ve Biyobelirteç Potansiyellerinin Araştırılması	
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 1 Karar No: 13	Tarih: 04.01.2018
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin kendisi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Hamidullah UYANIK
Üye

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Doç.Dr.İlker İNCE
Üye

Doç.Dr.Atilla ÇAYIR
Üye

Yrd.Doç.Dr.Binali FIRINCI
Üye

Yrd.Doç.Dr.Zahide KOŞAN
Üye

Emrah MELETLİOĞLU
Üye