



**RENAL HÜCRE KARSİNOMUNUN MALDI
KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE GLİKAN
DÜZEYİNDE İNCELENMESİ**

Ahmet ÇALIŞKAN

**2022
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet KAYILI**

**RENAL HÜCRE KARSİNOMUNUN MALDI KÜTLE SPEKTROMETRESİ
İLE GLİKAN DÜZEYİNDE İNCELENMESİ**

Ahmet ÇALIŞKAN

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet KAYILI**

**KARABÜK
Ocak 2022**

Ahmet ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan “RENAL HÜCRE KARSİNOMUNUN MALDI KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE GLİKAN DÜZEYİNDE İNCELENMESİ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet KAYILI

.....

Tez Danışmanı, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 27/01/2022

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. Sercan KARAV (ÇOMÜ)

Çevrimiçi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet KAYILI (KBÜ)

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILMAZ (KBÜ)

.....

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Ahmet ÇALIŞKAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RENAL HÜCRE KARSİNOMUNUN MALDI KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE GLİKAN DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

Ahmet ÇALIŞKAN

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet KAYILI

Ocak 2022, 68 sayfa

Renal hücreli böbrek kanseri, böbrek kanseri tipleri içerisinde görülen en yaygın türdür. Renal hücreli karsinomda kanser dokuları üzerinde *N*-glikozilasyon profillerinin incelendiği çalışma sayısı çok azdır. Bu tez kapsamında, böbrek kanseri glikan profillerinin MALDI kütle spektrometresi ile incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, parafilm ile kaplanmış ve formalin ile sabitlenmiş dokular çalışmada kullanılmıştır. İlk olarak, dokulardan parafilm uzaklaştırılmıştır ve dokulardan proteinlerin ekstraksiyonu, kloroform/methanol yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen glikoproteinlerden *N*-glikanlarının salınımı sonrası glikanlar, 2-amino benzoik asit (2-AA) ile etiketlendi. Son olarak sırasıyla selüloz ve gözenekli grafitize karbon içeren malzemeler ile saflaştırma işlemlerinden geçirildi. 2-AA etiketli *N*-glikanların analizleri MALDI-MS ile gerçekleştirildi. Analizler sonucunda toplam 33 adet *N*-glikan tespit edildi. Tespit edilen *N*-glikanların yapısal doğrulamaları tandem MS/MS analizleri ile gerçekleştirilmiştir ve *N*-glikanlar yapısal özelliklerine göre

gruplandırılmıştır. Bu analizler sonucunda tespit edilen *N*-glikanların göreceli bollukları, toplam alan normalizasyon yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır. İstatiksel analizler nötr *N*-glikanlara ve bu glikanlardan türetilen *N*-glikan gruplarına uygulanmıştır. Çoklu T testi ve Mann Whitney U testi ile yapılan istatiksel analizler ($p<0,05$ anlamlı ve $p<0,001$ çok anlamlı) bisektik *N*-glikan tipinde kanserli ve kanser içermeyen dokular arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermiştir. ROC analizi sonucuna göre de anlamlı değişimler gösteren *N*-glikanların renal hücreli karsinomda kanser tespiti için biyobelirteç olarak kullanılmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler : Renal hücreli karsinom, böbrek kanseri, *N*-Glikan, glikozilasyon, kütle spektrometresi, MALDI, Kanser biyobelirteci

Bilim Kodu : 92509

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATING OF RENAL CELL CARCINOMA BY MALDI MASS SPECTROMETRY AT THE GLYCAN LEVEL

Ahmet ÇALIŞKAN

**Karabük University
Institute of Graduate Programs
Department of Biomedical Engineering**

Thesis Advisor:

Asist. Prof. Dr. Hacı Mehmet KAYILI

January 2022, 68 pages

Renal cell kidney carcinoma is the most common type of kidney cancer. The number of studies examining *N*-glycosylation profiles on cancer tissues in renal cell carcinoma is very few. In this thesis, it is aimed to investigate kidney cancer *N*-glycan profiles with MALDI mass spectrometry. In this context, tissues covered with parafilm and fixed with formalin were used in the study. First, the parafilm was removed from the tissues and the extraction of the proteins was performed by the chloroform/methanol method. After the release of *N*-glycans from the extracted glycoproteins, the glycans were labeled with 2-amino benzoic acid (2-AA). Finally, they were purified with materials containing cellulose and porous graphitized carbon, respectively. Analyzes of 2-AA-labeled *N*-glycans were performed by MALDI-MS. As a result of the analyses, a total of 33 *N*-glycans were detected. Structural confirmations of detected *N*-glycans were performed by tandem MS/MS analyzes and *N*-glycans were grouped according to their structural features. The relative abundances of *N*-glycans detected

as a result of these analyzes were calculated using the total area normalization approach. Statistical analyzes were applied to neutral *N*-glycans and *N*-glycan groups derived from these glycans. Statistical analyzes with multiple T test and Mann Whitney U test ($p < 0.05$ significant and $p < 0.001$ very significant) showed that there was a significant difference between cancerous and healthy tissues in bisecting *N*-glycan type. It has been found that *N*-glycans, which show significant changes according to the ROC analysis result, could be effective in using as a biomarker for cancer detection in renal cell carcinoma.

Key Word : Renal cell carcinoma, kidney cancer, N-Glycan, Glycosylation, Mass spectrometry, MALDI, Cancer biomarker

Science Code : 92509

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, zor zamanlar geçirsem de desteğini esirgemeyen sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet Kayılı hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kanserli dokuların temin edilmesinde yardımcı olan Karabük Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi patoloji birimi çalışanlarına ve Dr. Harun Erol hocama teşekkür ederim. Çalışmada standart MALDI analizlerinin ve görüntülerinin elde edilmesinde Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Kütle spektrometresi Araştırma Laboratuvar imkanlarını kullanmamızı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Bekir Salih'e, aynı laboratuvarda analizlerde yardımcı olan başta Serhat Öztürk olmak üzere tüm araştırmacılara teşekkür ederim

Bu tez çalışması, Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından FYL-2020-2174 kodlu tez projesi kapsamında desteklenmiştir. Bundan dolayı Karabük Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne ve Karabük Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Yüksek lisansa beraber başladığım, bu yolda neredeyse beraber yürüdüğüm Deniz Baran Demirhan'a ve tezin deneysel aşamalarında yardımcı olan Sena Damar'a teşekkür ederim.

Sevgili aileme manevi hiçbir yardımı esirgmeden yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	2
2.1 PROTEİN GLİKOZİLASYONU	2
2.2. <i>N</i> -GLİKOZİLASYON.....	4
2.2.1. <i>N</i> -Glikozilasyon Modifikasyonları	5
2.3. <i>O</i> -GLİKOZİLASYON	6
2.4. GLİKOZİLASYON VE KANSER İLİŞKİSİ	7
2.4.1. <i>N</i> -Glikan Fukozilasyonunda Artış	8
2.4.2. Müsinlerde, T, T _n , Siyalillerde Artış ve <i>O</i> -Glikanlarda Azalma	9
2.4.3 <i>N</i> -Glikan Siyalizasyonunda Artış	10
2.5. KÜTLE SPEKTROMETRESİ	12
2.5.1. İyonlaştırma Teknikleri	18
2.5.1.1. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) Tekniği	19
2.5.1.2. Matris Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI)	21
2.5.2 Kütle Analizörleri	24
2.5.2.1. Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü (TOF)	26
2.5.2.2. Dört Kutuplu Kütle Analizörü	27

	<u>Sayfa</u>
2.6 MALDI GÖRÜNTÜLEME	28
2.7. GLİKAN ANALİZLERİ İÇİN ÖRNEK HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ	30
2.7.1. <i>N</i> -Glikanların Salınımı	31
2.7.2. <i>N</i> -Glikanların Etiketlenmesi	32
2.7.3. <i>N</i> -Glikanların Saflaştırılması	33
2.8. <i>N</i> -GLİKANLARIN KROMATOĞRAFİK AYRILMALARI	34
2.8.1. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (HILIC)	35
2.9. <i>N</i> -GLİKAN YAPILARININ TANIMLANMASI (FLORESANS TABANLI ETİKETLEME)	35
2.9.1. <i>N</i> -Glikanlar İçin Kütle Spektrometrik Analizler	36
2.10. BÖBREK KANSERİ	36
BÖLÜM 3	37
3.1. KULLANILAN MATERYALLER	37
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	37
3.2. DOKULARDAN PARAFİNİN UZAKLAŞTIRILMASI.....	37
3.3. PROTEİNLERİN EKSTRAKSİYON İŞLEMİ	38
3.4. <i>N</i> -GLİKAN SALINIM İŞLEMİ.....	38
3.5. 2-AA ETİKİTLEME İŞLEMİ.....	38
3.6. SELÜLOZ İÇEREN KATI FAZ EKSTRAKSİYON KARTUŞLARI İLE 2- AA ETİKİTTLİ <i>N</i> -GLİKANLARIN SAFLAŞTIRILMASI.....	39
3.7. GÖZENEKLİ KARBON KATI FAZ EKSTRAKSİYONU İLE 2-AA ETİKİTTLİ <i>N</i> -GLİKANLARIN SAFLAŞTIRILMASI (CARBON SPE)	39
3.8. MALDI-MS ANALİZLERİ	40
3.9. VERİ ANALİZLERİ	40
3.10. İSTATİSTİK ANALİZLER	40
BÖLÜM 4	42
4.1. BÖBREK DOKULARINDAKİ <i>N</i> -GLİKANLARIN MALDI-MS VE MALDI-MS/MS ANALİZİ.....	42
4.2. <i>N</i> -GLİKANLARIN İSTATİSTİKSEL OLARAK KIYASLANMASI.....	48
4.2.1. Çoklu T-Testi (Parametrik Varsayım)	49

	<u>Sayfa</u>
4.2.2. Mann Whitney U Testi (Parametrik Olmayan)	51
4.2.1.1. N-Glikan Gruplarının Yanıt Tahmin Yetenekleri (ROC Analizi) ..	55
BÖLÜM 5	58
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
EK AÇIKLAMALAR A. ETİK KURUL İZİNİ	66
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Bazı monosakkaritlerin temsili gösterimi	3
Şekil 2.2. a) <i>N</i> -asetilgalaktozamin 1 nolu karbonu serin ve treonin aminoasitinin hidroksil grubuna bağlanırsa <i>O</i> -Bağlı, b) <i>N</i> -asetilglukozamin ise asparajin aminoasitinin amid grubuna bağlanırsa <i>N</i> -Bağlı	4
Şekil 2.3. <i>N</i> -Glikozilasyon ER ve golgideki süreçleri	5
Şekil 2.4. Soldan sağa doğru; oligomannoz, kompleks ve hybrid yapı	6
Şekil 2.5. <i>O</i> -glikozilasyon biyosentezi.....	7
Şekil 2.6. Sırasıyla (A, B, C, D) malignant tümör oluşma evresi	8
Şekil 2.7. En sağdaki yapıda FUT8 enziminin aktivitesi sonucu oluşan aşırı fukozlanma, tümör hücrelerinde bolca görülmektedir	9
Şekil 2.8. Sağda normal ve Solda kanserli eksik glikozilasyon müsin	10
Şekil 2.9. Ovaryum ya da meme kanser; Gnt-III, Gnt-IV, Gnt-V VE FUT8 enzimlerinin aktiviteleri şekilde gözükmemektedir. Sağ üst tarafta glikanların uç modifikasyonları, bir alt kısımda ise siyalizasyon gösterilmiştir	11
Şekil 2.10.Kororektal kanser için <i>N</i> -Glikanlardaki değişimler	12
Şekil 2.11.Protein glikozilasyonu boyunca değişimler. Tn, STn, T antijenleri oluşumu, fukozlanmış zincirler ve metastaz. Kırmızı kutucuk içerisinde alınmış moleküller kanser belirtilerini temsil etmektedir	12
Şekil 2.12.Temel kütle spektrometrik işleyiş diyagramı.....	13
Şekil 2.13.Kütle spektrometresi ayrıntılı işleyiş diyagramı	14
Şekil 2.14.Katyonun ayrılma durumları.....	16
Şekil 2.15.Metanol örneğinin oluşan kütle/yük oranı ve bulunma bollukları.....	16
Şekil 2.16.Düşük kütleli hidrokarbonun elektrik iyonizasyon kütle spektrumu.....	17
Şekil 2.17.Örnek ve iyonlaştırma yöntemine göre teknikler.....	19
Şekil 2.18.ESI kaynak şeması	20
Şekil 2.19.ESI genel şeması	21
Şekil 2.20.MALDI iyonlaşma şeması	23
Şekil 2.21.MALDI-TOF kütle spektrometrik yöntem resmi	23
Şekil 2.22.A) Geleneksel TOF B) Yansıtılamalı TOF, A2 iyonu dedektöre daha geç vardığı için kütle olarak A1'den büyüktür	27
Şekil 2.23.Dört kutuplu analizör	28

Sayfa

Şekil 2.24.MALDI görüntüleme aşamaları	29
Şekil 2.25.MALDI görüntüleme; örnek hazırlama, kütle spektrometrik işlem, veri analizi.....	30
Şekil 4.1. MALDI-MS analizi; kanser ve sağlıklı doku için kütle spektrometresi. ...	43
Şekil 4.2. MALDI-MS/MS analizi; bazı <i>N</i> -glikanların parçalanma fragmentleri	47
Şekil 4.3. MALDI MS/MS sonucu ispat edilmiş bazı <i>N</i> -glikanlar, soldan sağa doğru	48
Şekil 4.4. <i>N</i> -glikan grafik; <i>N</i> -glikanların kanser ve kontrol dokudaki göreceli bollukları.....	49
Şekil 4.5. <i>N</i> -Glikan grafik; <i>N</i> -Glikan kompozisyonlarının kanser ve kontrol dokudaki göreceli bollukları.....	49
Şekil 4.6. <i>N</i> -Glikan kompozisyonları normallik grafiği.....	52
Şekil 4.7. <i>N</i> -Glikan normallik grafiği	52
Şekil 4.8. Bisektik <i>N</i> -Glikan; kanser ve sağlıklı doku için bisektik <i>N</i> -Glikan kompozisyonuna ait göreceli bolluk grafiği.	54
Şekil 4.9. Bisektik <i>N</i> -Glikan.	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Aminoasit ve monosakkaritler	3
Çizelge 2.2. Kütle analizörlerinin karşılaştırılması	25
Çizelge 4.1. MALDI-MS analizi; <i>N</i> -glikan kompozisyonları ve m/z oranı	44
Çizelge 4.2. <i>N</i> -Glikan Klasik Çoklu T-testi sonuçları.	50
Çizelge 4.3. <i>N</i> -Glikan Kompozisyonu Klasik Çoklu T-testi sonuçları.....	50
Çizelge 4.4. <i>N</i> -Glikan Mann testi sonuçları	53
Çizelge 4.5. <i>N</i> -Glikan kompozisyon Mann testi sonuçları	53
Çizelge 4.6. Bisektik kompozisyonların ROC yorumlaması	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mmol/L	: Her Bir Litredeki Milimol
Da	: Dalton
H	: Hidrojen
C	: Karbon
m/z	: Kütle Yük Oranı
Th	: Thomson
dH ₂ O	: Distile Su

KISALTMALAR

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
DHB	: 2,5-Dihidrobenzoik Asit
FFPE	: Formalinle Sabitlenmiş Parafine Gömülü Doku
Gal	: Galaktoz
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi
ABEE	: 4-Aminobenzoik Asit Etil Ester
PHN	: Fenilhidrazin
SPE	: Solid Phase Extraction (Katı Faz Ekstraksiyonu)
UV	: Ultraviyole
DTT	: Dithiothreitol
RFMS	: Rapiflour-MS
NHS	: N-Hidroksisüksinimid
LAC	: Lektin Afinite Chromatography (Lektin Afiniti Kromatografisi)
RCC	: Renal Cell Carcinoma (Renal Hücre Kanseri)
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
MR	: Manyetik Rezonans
USG	: Ultasonagrafi
RPM	: Revolutions Per Minute (Dakika Başına Dönüş)
RCF	: Relative Centrifugal Field (Göreceli Santifuj Kuvveti)
GPC	: Graphitic Porous Carbon (Grafit Gözenekli Karbon)
ROC	: Receiver Operating Characteristic (Alıcı İşletim Karakteristiği)
GlcNac	: N-Asetilglukozamin
ASN	: Asparjin
ER	: Endoplazmik Retikulum

FUT8	: Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase
DHB	: 2,5-Dihidrobenzoikasit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ESI	: Electrospray Ionization (Elektrosprey İyonizasyon)
HOBt	: 1-Hidroksibenzotriazol
Man	: MannoZ
mRNA	: Mesajcı-Ribonükleik Asit
MS	: Mass Spectrometry (Kütle Spektrometresi)
NeuAc	: Siyalik Asit (<i>N</i> -Asetilneuraminik Asit)
<i>N</i> -Glikan	: Azot Atomu Üzerinden Proteine Bağlı Oligosakkaritler
PNGase F	: Peptid Endo- β - <i>N</i> -asetilglukozaminodaz F Enzimi
RNA	: Ribonükleik Asit
TFA	: Trifloro Asetik Asit
TOF	: Time-of-flight (Uçuş-zamanlı)

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kanser özellikle son yüzyılın en tehlikeli ve en korkulan hastalıklarındandır. Kanser, temelde genetik problemlerden dolayı hücrelerin anormal hareketleri ve çoğalmasından kaynaklanmaktadır. Metastaz ile de diğer dokulara ve organlarda çoğalmaktadır. Vücudun çoğu yerinde görülebilen kanser, böbrek dokularında da görülebilmektedir. Renal karsinom da denenen böbrek kanserinin çeşitli alt tipleri vardır. Bunlardan en çok görüleni renal hücreli karsinomdur. Bilim insanları, renal hücreli karsinom ve diğer kanser türlerinin ölümcüllüğünü azaltmak için çeşitli tanı ve tedavi yolları araştırmaktadırlar. Bu yollardan biri de biyobelirteç olarak değerlendirilebilecek moleküllerden olan glikanlardır.

Glikozilasyon, hücrenin temel proseslerinden biridir. Glikozilasyon sürecinde oluşabilecek herhangi bir eksiklik ya da fazlalık, kanser riskini arttırmaktadır. Bu yüzden de kanser teşhisinde glikanlar önem taşımaktadır. Örneğin; kanserli/tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre siyalik asit ve fukoz artışı görülmektedir. Glikanların analizlerinde ise en sıklıkla kullanılan teknik kütle spektrometresidir.

Moleküler ağırlıkların yüklü iyonlara dönüştürülerek yapılan ölçme işlemi ya da molekül yapısının çıkarılmasına kütle spektrometresi denir. Kütle spektrometresi; gaz fazında iyonik yapılar oluşturma, yüklü parçacıkların kütle/yük oranına göre ayrılması ve detektöre ulaşma süresi ya da konumuna göre ölçülmesi prensibine dayanır. Giriş bölmesi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör, bilgisayar ve veri sistemi ve vakum sisteminden oluşmaktadır. Çeşitli kütle spektrometrik yöntemler bulunmaktadır. Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI) yöntemi kütle spektrometrik yöntemler arasında yeni nesil teknolojilerdendir.

MALDI-MS, glikanların (yüksek heterojenlik ve düşük bolluk) analizinde yüksek verimliliğe sahip olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır. MALDI, çözücünün buharlaşması sonrası, örneğe gönderilen lazer ışınları sayesinde iyonlaşan örneğin yüksek vakum etkisinden çeşitli analizörlerden geçerek analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır. Hızlı ve yüksek çözünürlüğe sahiptir. MALDI-Görüntüleme ile dokular, kütle/yük oranlarına göre haritalandırılabilirler.

Renal hücreli karsinomun incelenmesi araştırmasının tez yazımında şu aşamalar izlenmiştir:

Giriş bölümünde çalışma hakkında kısa bilgilendirme yapılmıştır.

İkinci bölümde *N*-glikozilasyon, *O*-glikozilasyon, glikozilasyon ve kanser ilişkisi, kütle spektrometresi ve kütle spektrometrik yöntemler, MALDI görüntüleme, glikan analizleri için örnek hazırlama yöntemleri, *N*-glikanların kromatografik ayrımları, *N*-glikanlar için kütle spektrometrik analizler ve böbrek kanserinden bahsedilmiştir.

Üçüncü bölümde deneyde kullanılan materyallerden, uygulanan deneysel işlemlerden, MALDI-MS analizlerinden, veri analizlerinden ve yapılan istatistik analizlerden bahsedilmiştir.

Dördüncü bölümde böbrek dokularındaki *N*-glikanların MALDI-MS ve MALDI-MS/MS analizlerinden, istatistik analizlerinden bahsedilmiştir.

Beşinci bölümde bu çalışma ve diğer benzer çalışmalar kıyaslanmış ve tartışılmıştır.

BÖLÜM 2

2.1 PROTEİN GLİKOZİLASYONU

Proteinler, hücrel faaliyetlerini gerçekleştirmek için bir takım post-translasyonel modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Bu modifikasyonlar sonucu proteinde oluşan; hücre etkileşimleri, hücre adhezyonu, immünolojik cevap, embriyolojik değişim, proteinin denaturasyona karşı korunması gibi yapısal, enzimsel, hücrel süreçlerde görev alan en önemli modifikasyon ve her 5 proteinde 1 gerçekleşen, oligosakkaritlerin proteinlere bağlanması sonucu glikoproteinlerin oluşması işlemine protein glikozilasyonu denmektedir [1,2]. Burada iki ana yapı oluşmaktadır. İlki protein ve karbonhidratlardan oluşan glikoprotein; ikincisi ise, sadece karbonhidratlardan oluşan glikoproteinlerden protein biriminin uzaklaştırılması ile oluşan glikan yapılarıdır. Glikanlar; fiziksel yapı, fiziksel koruma ve doku elastisitesi, kayganlık, su geçirgenliği, difüzyon bariyeri, hücre zarı organizasyonu, ekstrasellüler matriks organizasyonu, moleküler fonksiyon, bakteri-virüs gibi organizmalara karşı tanıma veya tutunma, hücre – matriks etkileşimi gibi hayati fonksiyonlarda görev almaktadır. Aynı zamanda yapısal proteinler, enzimler ve hormonların yapılarında bolca bulunabilmektedirler [3,4]. Glikozilasyon sonucu oluşan bu yapılarda mutasyon benzeri herhangi bir normal dışı durumun olması istenmemektedir. Herhangi bir mutasyon olduğu zaman hücredeki önemli fonksiyonlar etkilenebileceği için, bu mutasyonel değişimin özellikle başta kanser olmak üzere önemli hastalıklarla korelasyon içerisinde olduğu düşünülmektedir. Glikozilasyon hücrede enzimatik süreçlerle oluşmaktadır. Bu enzimler glikozidazlar ve glikoziltransferazlardır. Glikozidazlar, endo ve ekzo olmak üzere 2 ayrı grupta incelenmektedir ve yıkıcı enzimler olup glikanları yıkarken, glikoziltransferazlar ise glikanların yapısını oluşturan şekerleri transfer ederek oligosakkarit yapı oluşturmaktadır [1]. Özellikle kanser metastazı gibi durumlarda etkisi olan glikoproteinlerin yapısında genelde; asparajin, threonin ve serin aminoasitleri ve galaktoz, glikoz, mannoz, *N*-Asetil-nöramik asit, fukoz, *N*-asetil-galaktozamin,

N-asetil-glikozamin ve ksiloz bulunabilmektedir. Şekil 2.1 ve çizelge 2.1’de toparlanmış bir şekilde gösterilmiştir [1,5,6].

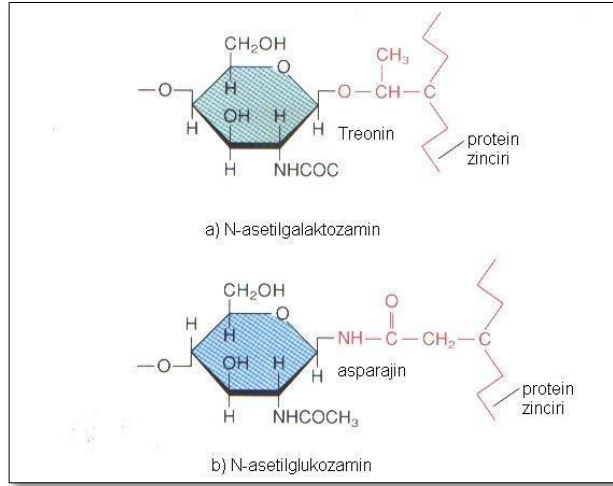
Çizelge 2.1. Aminoasit ve monosakkaritler [6].

Organik Molekül	Aminoasit	Monosakkarit (şeker)
Asparajin	X	
Serin	X	
Treonin	X	
hidroksilizin	X	
Hidroksiplorin	X	
Galaktoz		X
Glikoz		X
Mannoz		X
N-Asetil-nöraminik Asit		X
Fukoz		X
N-asetil-galaktozamin		X
N-asetil-glikozamin		X
ksiloz		X

● Galactose (Gal)	★ Xylose (Xyl)
■ N-Acetylgalactosamine (GalNAc)	◆ N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)
▨ Galactosamine (GalN)	◇ N-Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)
● Glucose (Glc)	◇ 2-Keto-3-deoxynononic acid (Kdn)
■ N-Acetylglucosamine (GlcNAc)	▲ Fucose (Fuc)
▨ Glucosamine (GlcN)	◆ Glucuronic acid (GlcA)
● Mannose (Man)	◆ Iduronic acid (IdoA)
■ N-Acetylmannosamine (ManNAc)	◆ Galacturonic acid (GalA)
▨ Mannosamine (ManN)	◆ Mannuronic acid (ManA)

Şekil 2.1. Bazı monosakkaritlerin temsili gösterimi [7].

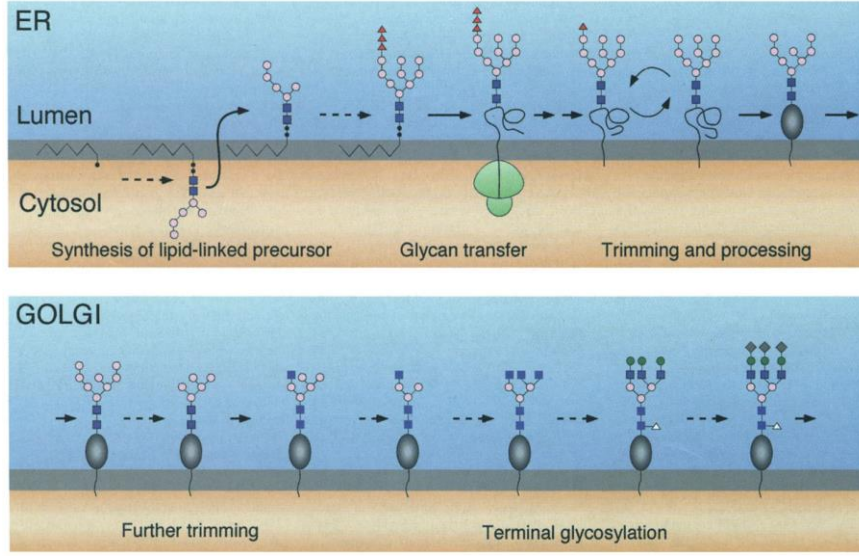
Endoplazmik retikulum ve golgi cisimciğinde gerçekleşen glikozilasyon, monosakkaritlerin yani şekerlerin aminoasitlere bağlanma şekline göre N bağlı ve O bağlı glikozilasyon olmak üzere 2 grupta incelenebilmektedir. Şekil 2.2’de N bağlı ve O bağlı glikozilasyonlar gösterilmektedir.



Şekil 2.2. a) N-asetilgalaktozamin 1 nolu karbonu serin ve treonin aminoasitinin hidroksil grubuna bağlanırsa *O*-Bağlı, b) *N*-asetilglukozamin ise asparajin aminoasitinin amid grubuna bağlanırsa *N*-Bağlı [6].

2.2. N-GLİKOZİLASYON

N-asetilglukozamin molekülünün glikozidik bağ ile asparajin aminoasidinin amid grubuna bağlanması ile oluşan glikozilasyon tipidir (şekil 2.2.b). Protein sentezi sırasında gerçekleşen *N*-glikozilasyon, protein glikozilasyonunun en iyi karakterize olmuş formudur [1]. Bu süreç ilk olarak GlcNac, mannoz ve glikoz içeren öncü oligosakkaritlerin oluşturulması ile başlar ve daha sonra Dol-P (lipit taşıyıcı) aracılığıyla peptidlere bağlanmak üzere endoplazmik retikulum lümenine gönderilmektedir. İkinci olarak oluşan bu oligosakkaritlerin polipeptid zincirine bağlanmasını sağlayacak glikoziltransferaz enzimleri tarafından tanınması ve bağlanması sonucu glikolizasyona uğraması için konsensus sekans dediğimiz yönlendirici bir sekansın olması gerekmektedir. Bunlar da, Asn – xxx – Ser veya Asn – xxx – Thr'dir ve xxx yerine herhangi bir aminoasid çeşidi düşünülebilmektedir (Prolin hariç). Üçüncü şart olarak 3 boyutlu yapıya sahip uygun protein yapının olması ve asparajin aminoasitinin endoplazmik retikulum lümeni tarafında olması gerekmektedir. En son aşama olarak da golgi cisimciğinde monosakkaritlerin bağlantılması sonucu *N*-glikozilasyon tamamlanmaktadır [1,4-8]. Şekil 2.3'de *N*-glikozilasyonun ER ve golgideki süreçleri gösterilmektedir.



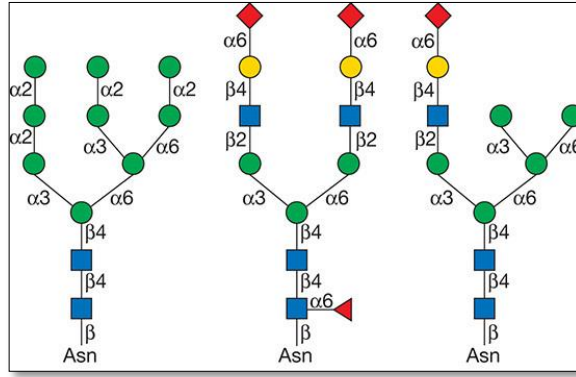
Şekil 2.3. *N*-Glikozilasyon ER ve golgideki süreçleri [9].

2.2.1. *N*-Glikozilasyon Modifikasyonları

Çeşitli kompleks glikanlar, glikoziltransferaz enzimleri tarafından oluşturulmaktadır. Bu formlanma sonucu temelde 3 farklı modifikasyon oluşmaktadır. Bunlar;

- Yüksek mannoz
- Hybrid
- Kompleks yapı

Her bir glikan, ortak çekirdek $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ (3 mannoz, 2 *N*-asetilglukozamin ve asparajin) yapısını içermektedir. Sadece mannoz monosakkaritlerinin çekirdeğe bağlanması sonucu oluşan yapıya oligomannoz, *N*-asetilglukozamin şekerine bağlanan monosakkaritler tarafından anten şeklinde oluşturulmuş yapıya kompleks, mannoz monosakkaritinin bir koluna sadece mannozların diğer koluna ise mannozlu anten yapısı ve diğer monosakkaritlerin bağlanması sonucu oluşan hybrid modifikasyon türüdür [1,6-8]. Şekilde 2.3’de *N*-glikozilasyon modifikasyonları gösterilmektedir.



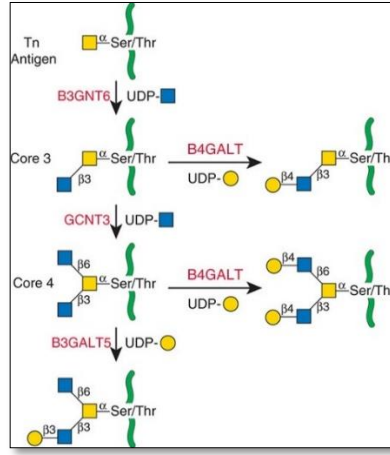
Şekil 2.4. Soldan sağa doğru; oligomannoz, kompleks ve hybrid yapı [7].

2.3. O-GLİKOZİLASYON

Genelde Serin ve Treonin aminoasitlerinin oksijen molekülüne monosakkaritlerin bağlanması ile oluşan glikozilasyon tipidir (şekil 2.2.b). Cis golgi'de başlar. UDP nükleotidleri monosakkaritlerin getirilmesini sağlamakta ve her monosakkaritin transferaz enzimi ile önce ilk monosakkarit olan N-asetilgalaktozamin 2 aminoasitten biriyle bağlantı kurmakta ve daha sonra diğer şekerler bağlanmaktadır. Bağlantı kurulan monosakkarit ve aminoasidin türüne göre çeşitli tipleri bulunmaktadır [4-6]. Bunlardan bazıları;

- Serin/Treonin – GalNAc (müsin tipi, en yaygın)
- Serin/Treonin – GlcNAc
- Serin/Treonin – Ksilen

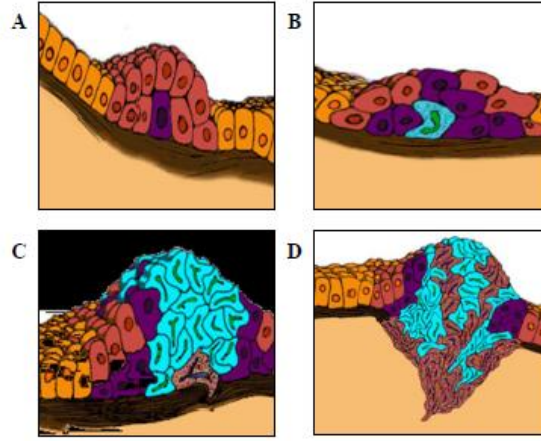
Şekil 5'de O-glikozilasyon biyosentezi gösterilmektedir.



Şekil 2.5. O-glikozilasyon biyosentezi [7].

2.4. GLİKOZİLASYON VE KANSER İLİŞKİSİ

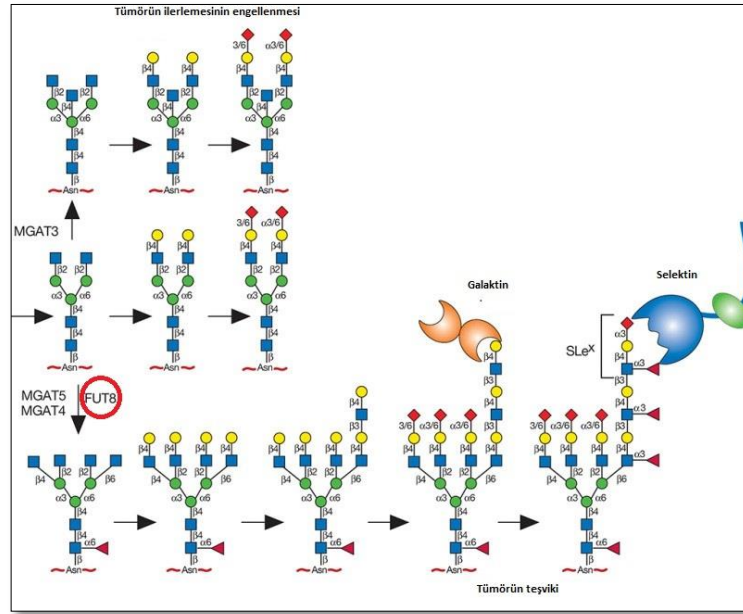
En önemli post-translasyonel modifikasyonlardan olan protein glikozilasyonu sonucu oluşan glikanlar hücrede; immünolojik cevap, hücreler arası etkileşim – iletişim gibi önem arz eden hücresel işlevlerde etkisi olduğu için, glikanlarda oluşabilecek herhangi bir mutasyon benzeri bozukluklar vücut sisteminde; enfeksiyon (bakteri, virus, parazit vb.), HIV, kistik fibroz, romatizmal artrit, Tay-Sachs gibi hastalıklara yol açabilmektedir [10]. Bu aksaklıkların en kötülerinden biri de kanser ve metastazdır. Kanser hastalığının oluşmasında glikanların bağlarındaki veya içeriklerindeki değişiklikler neden olmakta hatta bir ileri evre olarak metastaza sebep olmaktadır [11,12]. Bunun sebebi ise enzimleri tetikleyen genler veya enzimlerde oluşan sorundan kaynaklanmaktadır. Bu yüzden protein glikozilasyonunu anlamak çok önemlidir. Genel olarak O-Glikanların glikozilasyonu yarım kalmış şekilde oluşabilirken, N-Glikanlarda bu durum O-Glikanlardan farklı olarak, aşırı dallanma ve sülfatlanmada da bir azalma gözlemlenmektedir [6]. Şekil 2.6'da malignant tümör oluşumu gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Sırasıyla (A, B, C, D) malignant tümör oluşma evresi [13].

2.4.1. *N*-Glikan Fukozilasyonunda Artış

N-asetilglukozamintransferaz 5 (GlcNAc-TV, GnT-V, MGAT5) enziminin aşırı aktivitesi sonucu β 1-6 *N*-glikan bağlarında (*N*-asetilglukozaminin mannozlu çekirdeğe bağlanması) bir artış görülmüştür [14,15]. Bazı insan tümörlerinde de GlcNAc aktivitesini katalizleyen MGAT5 geni tarafından tetiklenen *N*-glikanları tanıma amaçlı yapılan Lectin (L-PHA) boyamasında artış görülmüştür. β 1-4 bağı oluşturulmasını tetiklenen MGAT4 geni de tümör ilerlemesinde etkilidir. MGAT4 (GnT-IV) ve MGAT5 genlerinin baskılanmasından dolayı GnT-V ve GnT-IV enzimlerinin aşırı çalışması sonucu oluşan aşırı dallanmalar da siyalizasyona ve fukozilasyona davetiye çıkarabilmektedir. Buna karşın mannozlara β 1-4 bağlantısı ile GlcNAc ekleyen GnT-III enziminin metastazı inhibe ettiği düşünülmektedir [16]. Glikan dış zincirinde fukozilasyonun artmasından dolayı selectin tarafından tanınan kan kanserinde Fuc-TVII, göğüs kanserinde Fuc-TVI enziminin etkisi ile sial Lewis x oluşumu tümör ilerleyişini tetiklemektedir. Fukozları *N*-glikan çekirdeklerine ekleyen FUT8 geninin tetiklediği Fuc-TVIII enziminin çalışmasındaki aşırı artış tümör hücrelerinde gözlemlenmiştir. Şekil 2.7-10-11'de gösterilmektedir [7,17]. Çeşitli kanserli hücrelerde, normal hücrelere göre fukoz seviyesinde de bir artış gözlemlenmiştir. Örnekle; normal bir hücredeki fukoz miktarı 8.9 mg/100 mL iken; mesane kanserinde 23 mg/100 mL, pankreas kanserinde 33.5 mg/100 mL, tiroid kanserinde 28 mg/100 mL ve mide kanserindeyse 29 mg/100 mL olarak gözlemlenmiştir [13]. Şekil 2.7'de FUT8 enzimi sonucu oluşan tümör süreci gösterilmektedir.

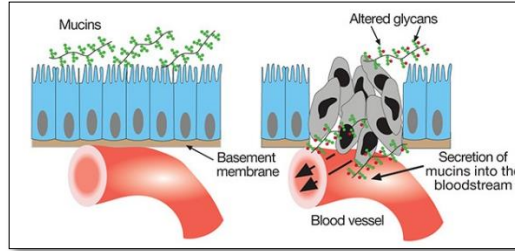


Şekil 2.7. En sağdaki yapıda FUT8 enziminin aktivitesi sonucu oluşan aşırı fukozlanma, tümör hücrelerinde bolca görülmektedir [7].

2.4.2. Müsinlerde, T, T_n, Siyalillerde Artış ve O-Glikanlarda Azalma

Müsinler, Serin ve treonin aminoasitleri üzerinde bir çok O-GalNac glikan taşıyan glikoproteinlerdir. Müsinlerde oluşabilecek düşük seviye glikozilasyonda, lektinler (*vicia villosa*, *arachis hypogea* vb.) tarafından tanımlanabilen ve bağlanılabilen T_n (göğüs kanserinin %90'ında, kolon, akciğer, mesane, yumurtalık, mide ve prostat kanserlerinin yaklaşık %70-80'inde yüksek oranda görülmektedir [18]) ve T antijenlerinin ekspresyonuna yol açabilmektedir. ST6GalNac I ya da ST6GalNac II enzimlerinin etkisiyle GalNac kalıntısının α -2-6 sializasyonunun eksik kalması yani olgunlaşmaması sonucunda ise sialyl T_n (sT_n) antijenleri üretilebilir [14]. Bu glikoproteinler (müsinler) genelde organ lümenlerinde bulunabilmektedir. Kötü huylu hücrelerde çözünen müsinler kana ve hücre dışı boşluğa girmektedir. Bu sebeple kanser hastalarının kanlarında, Siyalil-T_n ve T_n gibi kesilmiş oligosakkaritlerle birlikte salgılanmış müsin görülebilmektedir ve kanser biyobelirteci için kullanılabilir [19]. Müsinlerin negatif yüklü olması da hücreler arası etkileşimi engellemektedir. Bu durumun da metastazı tetiklediği düşünülmektedir. Ayrıca hücreler arası uyum için antijenik peptit tanınmasını da aşırı siyalizasyondan dolayı maskeleyebilmektedir. Dokularda ve kanda yer edinen tümör hücrelerin yüzeylerinde

de bolca anormal müsin bulunduğu da gözlemlenmiştir [7,14]. şekilde 2.8’de normal ve eksik glikozilasyon msini görülmektedir.



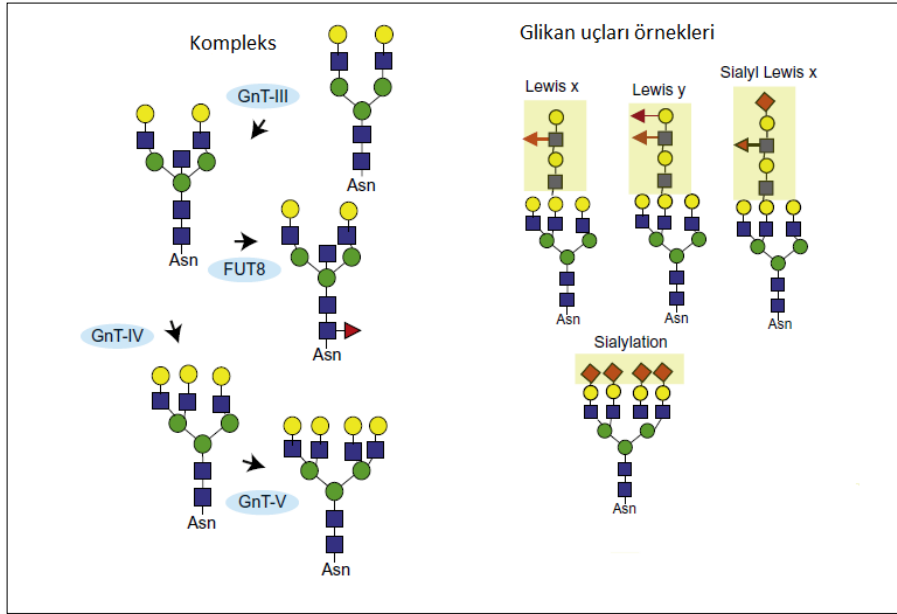
şekil 2.8. Sağda normal ve Solda kanserli eksik glikozilasyon müsin [7].

2.4.3 *N*-Glikan Siyalizasyonunda Artış

Negatif yapıya sahip siyalik asit, çoğunlukla terminal pozisyonda olan, selektin ve lektinlere bağlanabilen, *N*-glikanların biyolojik rollerini etkileyen önemli bir monosakkarittir. Bütün gastrointestinal sistemin hücre yüzeyinde ve salgılanan moleküller üzerinde bu yapının yoğunluğu fazladır. Bazen bu fazlalık belli çoğu çeşitli kanser tiplerinde aşırıya kağabilmektedir. Bunun sebepleri; siyalil transferaz veya glikozidaz enzimlerinin düzensiz çalışması ya da potansiyel siyalizasyon bölgelerinin artmasından kaynaklanmaktadır. Terminal siyalizasyon α 2,6-bağlı ve α 2,3-bağlı olmak üzere 2 şekilde olabilmektedir. Spesifik bir örnekle; kolon kanserinde, *N*-glikanlardaki α 2,6 – siyalil transferaz enzimi aktivitesi sonucu α 2,6-bağlı siyalik asit oranındaki artış kanser gelişmesi ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Fakat α 2,3-bağlı siyalik asit (aynı zamanda sialil lewis antijenlerinin ana bileşeni) kolon kanserindeki oranında bazı çalışmalarda artış gözlenirken bazılarında sağlıklı dokulara göre belirgin bir artış gözlemlenmemiştir. Fakat Pankreatik kanserde ise belirgin bir artış gözlemlenmiştir [7,11]. Yapılan araştırmalarda kanserli hücrelerdeki siyalik asit oranının siyalil transferaz enzimindeki çalışma bozukluğu sonucu arttığı görülmüştür ve bu sebeple kanserli hücrelerde tutunma güçlüğü ortaya çıktığı için metastaz yapması da kolaylaşmaktadır. Ayrıca bazı kanser hücreleri de tümöre özgü antijenleri, siyalik asit yoğunluğu nedeniyle bu hücreler fagositik olaydan kağabilmektedirler. rnekle; normal bir hücrede serum toplam siyalik asit miktarı 1.74 mmol/L iken; göğüs kanserinde 2.86, kan kanserinde 3.06, pankreasta 3.20, prostatta 3.27, tiroid

kanserinde 2.40, deride 2.59, mesana kanserinde 3.19 ve böbrek kanserinde ise 3.38 mmol/L olduğu gözlemlenmiştir [6,13,14].

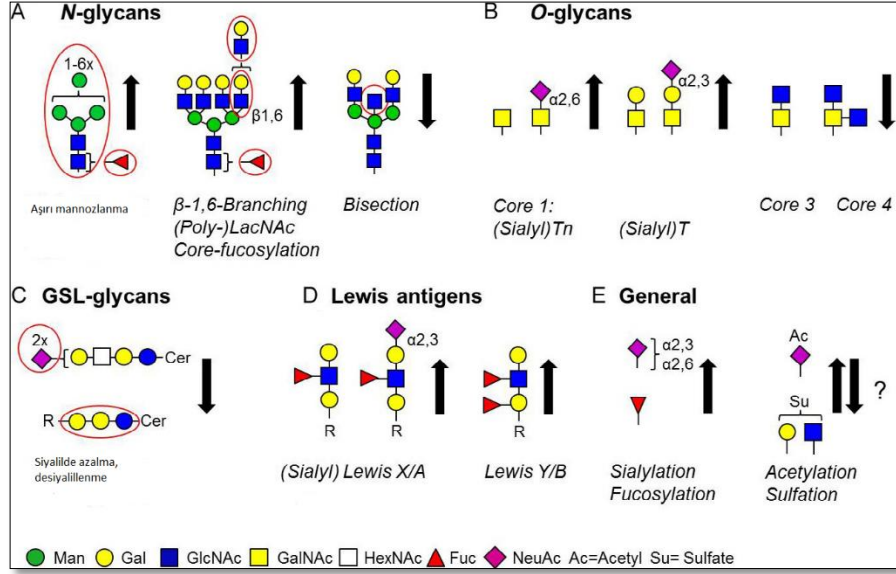
Ayrıca; β 1-3 GlcNAc ve β 1-6 GlcNAc transferaz enzimlerinin aktivitesi sonucu oluşan polilaktozamin sırasıyla N- ve O- glikanlarda bulunabilmektedir. I ve i antijenleri olarak bilinen lakto serisi zincirlerinde genişleme olması için galaktozlar β 1-3 GlcNAc ve β 1-6 GlcNAc aracılığıyla GlnNAc'lara bağlanabilir ve bahsedilen antijenlerin malignant kanserle ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca oluşan bu yapılar sadece malignantla ilişkili olmamakla beraber kan grubu belirlenmesinde rol oynayan lewis antijenleri ve türevlerine (Le^y , Le^x gibi) sebep olan fukozilasyon ve siyalizasyona da davetiye çıkarmaktadır [11,14,20,21]. Şekilde 2.9, 10 ve 11'de kanser oluşumundaki modifikasyon farklılıkları gösterilmektedir.



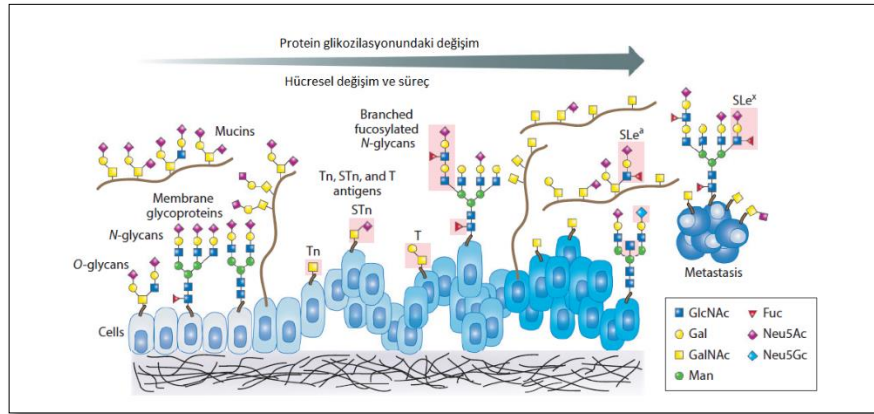
Şekil 2.9. Ovaryum ya da meme kanser; Gnt-III, Gnt-IV, Gnt-V VE FUT8 enzimlerinin aktiviteleri şekilde gözükmektedir. Sağ üst tarafta glikanların uç modifikasyonları, bir alt kısımda ise siyalizasyon gösterilmiştir [11].

Şekil 2.10'da kororektal kanserde gözlenen değişimler gösterilmektedir. A'da Yüksek mannozlanma, çekirdek fukoizlanmasında artış, bisektik ve GlnNAc bağlantısında azalma, B'de 1. çekirdekteki T ve Tn antijenleri artarken 3 ve 4. Çekirdeklerde azalma görülmektedir. C'de Glikosfingolipidlerde (GSL) siyalillenmede azalmak görülmektedir. D'de Lewis tipi antijenlerde artma ve E'de Genel olarak siyalizasyonda

ve fukoziilasyonda artış görülmekte fakat sülfatlanmada ve asetillenmede kesin bir sonuç görülmemektedir [11].



Şekil 2.10. Kororektal kanser için N-Glikanlardaki değişimler [11].



Şekil 2.11. Protein glikozilasyonu boyunca değişimler. Tn, STn, T antijenleri oluşumu, fukoziilasylanmış zincirler ve metastaz. Kırmızı kutucuk içerisinde alınmış moleküller kanser belirtilerini temsil etmektedir [22].

2.5. KÜTLE SPEKTROMETRESİ

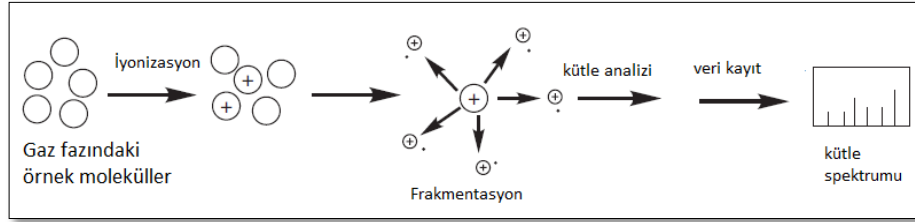
Kütle spektrometresi, atomların ve bileşiklerin moleküler ağırlıklarını yüklü iyonlara dönüştürerek ölçme işlemi veya herhangi bir molekülün yapısını çıkarma işlemi olarak tasfir edilebilmektedir [23]. 500.000 Da kütleli molekülleri bile ölçebilen kütle

spektrometresi, son yıllarda hızlı bir şekilde ilerleyiş göstermiştir [24]. Bu ilerleyiş yeni tekniklerin, cihazların ortaya çıkmasına ve halihazırda kullanılan tekniklerin de gelişmesine yol açmıştır. Özellikle proteomik (bakteri tanımlama gibi), metabolik gibi çalışma alanları için bu gelişme çok faydalı olmuştur [25]. Kütle spektrometresi, biyokimya, fizik, arkeoloji, gıda sektörü, petrol endüstrisi, adli bilim ve malzeme bilimi gibi bir çok alanda kullanılmaktadır [23,26,27].

İyonların hareketini ve yönünü deneysel olarak tespit etmek ve yönlendirmek kolay olduğu için kütle spektrometresinde örneklerin iyonlaştırılması gerekmektedir. Kütle spektrometresi temelde 3 adımdan oluşmaktadır [23];

- Analit atom veya moleküllerden iyonlaştırma teknikleri ile gaz fazında iyonik türler oluşturmak
- Diğer adım; moleküler iyonların ve bunların yüklü parçalanmalarının kütle/yük oranına göre ayrılması ve kütle analizi yapılması
- Dedektöre doğru gelen iyon akımı belli kütle analiz yöntemlerine göre ölçülüp kütle spektrumunun oluşturulması

Şekil 2.12’de temel kütle spektrometrik sürecin işleyiş diyagramı gösterilmektedir.



Şekil 2.12. Temel kütle spektrometrik işleyiş diyagramı [23].

İlk iki adım, iyonların birbirine çarpmadan rahat bir şekilde hareket edebileceği yüksek vakum altında gerçekleşir. Çünkü atmosferik basınç ve iyonların birbiri ile çarpışarak farklı ürünler elde etmesi, analizlerin doğruluğunu ve netliğini düşürebilmektedir. Şekil 2.13’de gösterilen kütle spektrometresi ve bileşenlerine ait bilgiler aşağıda verilmiştir [23]:

Giriş bölümü: Örneğin koyulduğu ve iyon kaynağına gönderileceği kısımdır.

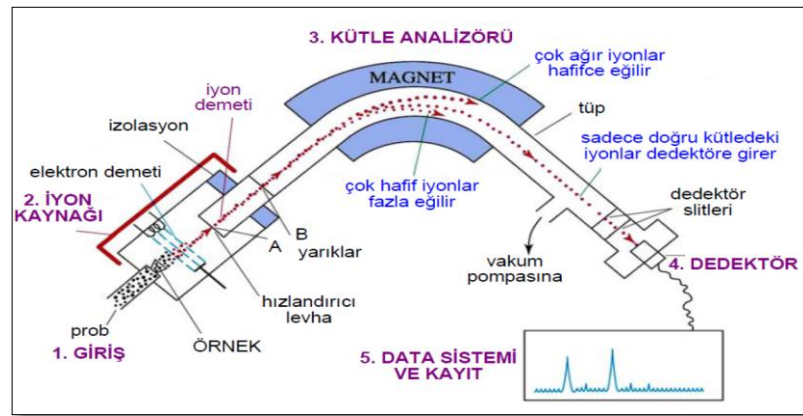
İyon kaynağı: Burada nötr moleküller gaz fazında iyonlara çeşitli iyonlaştırma teknikleri (ESI, MALDI) ile dönüştürülmektedir.

Kütle analizörü: Manyetik veya elektrik alanları gibi yöntemlerle iyonların hareketi kontrol edilerek iyonların ayrıştırılması ve kütle analizi (Uçuş zamanlı, 4 kutuplu) yapılmaktadır.

Dedektör: Kütle analizi sonucu belli orana göre ayrılmış iyon akımını ölçer ve anlamlı hale getirmek ve bilgisayar ortamına aktarmak için yükseltilmektedir.

Bilgisayar ve veri sistemi: Görsel bir kütle spektrum oluşturmakta ve verileri depolamaktadır.

Vakum sistemi: Kütle spektrometresine düşük basınç sağlamaktadır. Kütle analizör bölgesini 10^{-8} torr gibi çok düşük bir basınçta tutulmasını sağlamaktadır. Kütle spektrometresinde elektronik kısım ise iyon kaynağından dedektöre her alanda kullanılmaktadır [23,27]. Şekil 2.13'de kütle spektrometresinin ayrıntılı işleyiş diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Kütle spektrometresi ayrıntılı işleyiş diyagramı [28].

Atom ve Moleküler Kütle:

Temel kütle birimi kilogramdır fakat; atom veya molekül gibi türleri kilogram cinsinden değerlendirmek zordur. Örneğin karbon atomunu kilogram cinsinden

yaklaşık $1.9927 \cdot 10^{-26}$ olarak ölçülmektedir. Bu yüzden de atom ve moleküllerin kütlesi birleşik atomik kütle birimi (u) cinsinden elde edilmektedir. Karbon atomu doğada ^{12}C ve ^{13}C olmak üzere 2 şekilde bulunmaktadır. Fakat ^{12}C izotopunun bulunma olasılığı %98.90 iken ^{13}C izotopu ise sadece %1.1'dir. Ayrıca H atomu da doğada bulunma oranı ^1H %99.98 ve ^2H %0.01 olmak üzere 2 izotopa sahiptir [29]. Ortak anlaşmaya göre de ^{12}C izotopunun bir atomunun kütlesi 12 olarak kabul edilmiştir. Yani 1 atomic kütle birimi ^{12}C izotopunun tek bir atomunu kütlelerinin 1/12'sine eşit olarak kabul edilmiştir. Karbon atomunun seçilmesinin nedeniyse, doğada en stabil halde ve çokça (%98.90) bulunduğu içindir [29]. Atomik kütle birimi "u" yerine de Dalton (Da) kullanılmaktadır. Sonuç olarak 1u değeri eşitlik 2.1'de gösterilmiştir [23].

$$1 \text{ u} = 1 \text{ Da} = 1.6605402 \cdot 10^{-27} \text{ kg} \pm 0.59 \text{ ppm} \quad (2.1)$$

Bunlar haricinde bazı farklı moleküler kütle terimleri kullanılmaktadır. Bunlar; her elementin en bol bulunan izotopunun tam sayı kütlesi eklenerek hesaplanan "**nominal iyon kütlesi ($^{12}\text{C} = 12$)**", her elementin en bol bulunan izotopunun tam külesinden hesaplanan "**monoizotopik iyon kütlesi ($^{12}\text{C} = 12.000000$)**", her bir elementin izotopik kütle ortalaması hesaplamasına dayanan "**ortalama kütle ($\text{C} = 12.01115$)**". Ortalama kütle, moleküler iyonların izotopik piklerinin dağılımının sentroidini temsil eder ve kimyada stokiyometrik hesaplamalarda kullanılmaktadır [23,30].

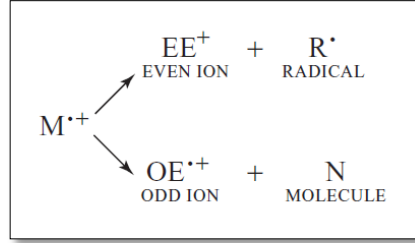
Anatomi:

Kütle spektrometresinde yapılacak ilk şey; analizi yapılacak komponenti iyonlaştırmaktır [27]. İlgili formül, eşitlik 2.2'de gösterilmektedir.



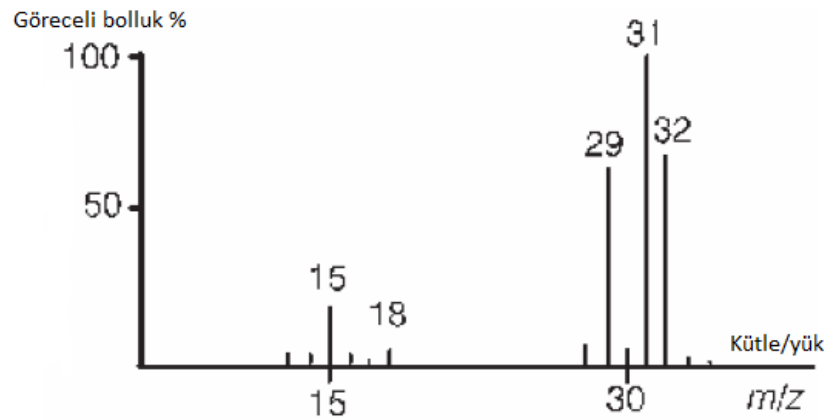
Genel olarak yüksek elektron demeti ile elektron koparılması sonucu yukarıda oluşan katyon, bir radikal ve çift elektronlu iyon ya da molekül ve tek elektron içeren farklı

kimyasal özelliklerle sahip fragmentlere ayrılabilir [23]. Oluşan ya da oluşabilecek iyonlar, kütle/yük (m/z) oranına göre kütle spektrometresinde ayrılır ve miktarları oranlı bir şekilde tespit edilir. Bunun sonucunda analiz edilen molekülün spektrumu oluşturulmuş olur [27]. Şekil 2.14’de katyonun ayrılma durumları gösterilmektedir.



Şekil 2.14. Katyonun ayrılma durumları [27].

Şekil 2.15’de elektron iyonlaştırma ile metanolün kütle spektrometresi çıkartılmıştır. X eksenini kütle/iyon oranı, y eksenini ise yüzdelik olarak bulunma oranlarını göstermektedir. Kütle/yük oranı en bol olan pik, baz tepe olarak ve %100 olarak düşünülür ve isimlendirilir. Diğerleri de baz tepe pikine göre orantılı şekilde değer alır [27]. Şekil 2.15’de bir örnek için geçerli kütle/yük oranı ve bulunma bollukları gösterilmektedir.



Şekil 2.15. Metanol örneğinin oluşan kütle/yük oranı ve bulunma bollukları [27].

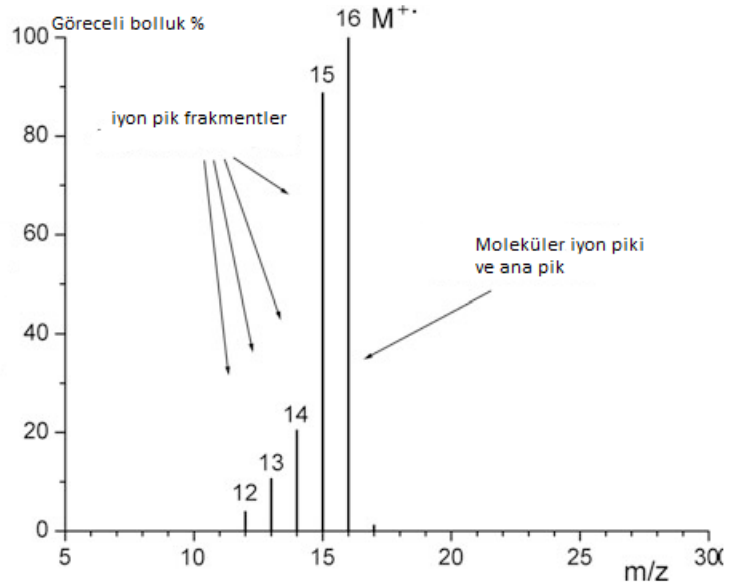
Kısaca kısaltmalardan bahsedilirse; iyonların toplam yükü “q”, electron yükü (bir electron yükü: 1.6×10^{-19} C) “e”, iyonların yük sayısı ise “z” olarak tasfir edilir. Buna göre toplam yük formülü eşitlik 2.3’de gösterilmiştir [27,31].

$$Q = z.e \quad (2.3)$$

Kütle, atomik kütle birimlerinde ve yük temel yük birimlerinde ifade edildiğinde, kütle/yük oranı boyut olarak u/e oranına sahiptir. Bu durumu daha da basitleştirmek için, Thomson (Th) birimi tavsiye edilmiştir. Bu birimi bazı bilim insanları m/z yerine kullanmaktadır; fakat Dalton birimi daha çok kullanılmaktadır [30]. Formülasyon olarak eşitlik 2.4’de gösterilmiştir [27].

$$1 \text{ Th} = 1 \text{ u/e} = 1.036426 \times 10^{-8} \text{ kg C}^{-1} \quad (2.4)$$

Şekil 2.16’da hidrokarbonun elektrik iyonizasyon kütle spekturumu gösterilmektedir.



Şekil 2.16. Düşük kütleli hidrokarbonun elektrik iyonizasyon kütle spekturumu [30].

Şekil 2.16’da CH_4 16 moleküler iyon pikinde gözükmektedir. Basitçe mantığını küçük işlemlerle açıklanırsa; karbonun atomik kütle ağırlığı 12, hidrojeninki 1, dört hidrojen atomu 4u, 1 karbon atomu 12u, toplamda 16u yapar. 16u nötral üründen 1 elektron çıkartılınca da m/z oranı 16 olarak algılanır ve spekturumda öyle gösterilmektedir [27,30].

Kütle spektrometresinin performansını etkileyen bazı unsurlar vardır. Bunlar; iyi tanımlanmış koşullar altında çalıştırıldığında belirli bir analit için herhangi bir sistemin genel yanıtını belirleyen yani her kullanılan analitin kütesine karşın, dedektöre ulaşan iyon yük miktarına göre belirlenen “**hassaslık**”, bir ölçümün belirsizliğini belirleyen yani sinyalin kalitesini (çözünürlüğünü) belirleyen “**sinyal/gürültü oranı**” ve gürültü sinyalinden ayırt edilebilen bir sinyal elde etmek için gereken en az analit miktarı olarak belirlenen “**tarama sınırı**” [30].

Genellenirse, kütle spektrometre yöntemleri; DNA analizleri, aminoasit dizilimleri, oligosakkarit ve lipitlerin dizilim analizleri, biyopolimerlerde, ilaç araştırmalarında, elementlerin kütesi ve izotop bolluğunda, organik bileşenlerin yapı analizinde, elemental analizde, hava ve sudaki kirliliklerde, özel hastalıkları tanımlamada, klinik çalışmalarda kullanılmaktadır [23].

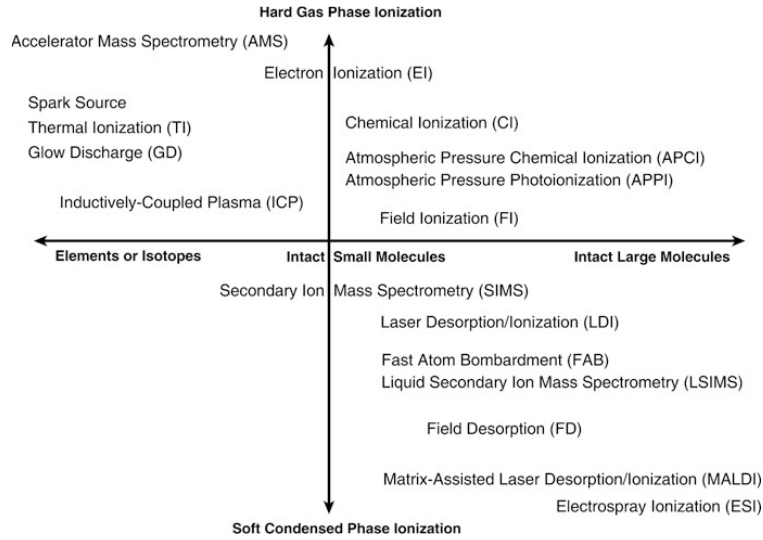
2.5.1. İyonlaştırma Teknikleri

Kütle spektrometresinde iyon kaynaklarının - iyonlaştırma tekniklerinin amacı, analit atomları veya moleküllerinden gaz fazında iyon oluşturmaktır. İyon kaynakları seçilirken yapılacak uygulamaya göre seçilmektedir. Yumuşak iyon kaynakları; protein, nükleik asit gibi büyük kırılğan moleküllerin bozulmamış iyonlarını üretebilmektedir. Kimyasal iyonizasyon gibi sert iyon kaynakları ise; analiti atomize eder ve doğru kantitatif veriler sağlayabilmektedir. Yani enerji seviyesi çoktur ve derin bir parçalama yapabilmektedir [27]. Coğrafi kökenini yansıtacak oranda küçük farklarla izotop oranı ölçümü için özellikle kullanılabilir. Hali hazırda kullanılan katı, gaz ve çözelti fazındaki örneklerine ayrı ayrı özel ve yüksek, orta, düşük vakumda, atmosferik basınçta çalışan çeşitli iyon kaynakları yani iyonlaştırma teknikleri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları [27,31];

- Hızlı atom bombardımanı
- Plazma desorpsiyonu
- Elektrospray iyonizasyonu (ESI)
- Lazer desorpsiyon
- Matriks destekli lazer desorpsiyon (MALDI)

- Alan desorpsiyonu
- Multifoton desorpsiyonu
- Kimyasal iyonizasyon
- Elektron iyonizasyon
- Termal iyonizasyon
- Fotoiyonizasyon
- Termospray iyonizasyon
- Gerçek zamanlı direkt analiz
- İkincil iyon kütle spektrometresi
- Atmosferik basınçlı matriks destekli lazer desorpsiyon

Şekil 2.17’de iyonlaştırma yöntemine göre kütle spektrometrik teknikler gösterilmektedir.

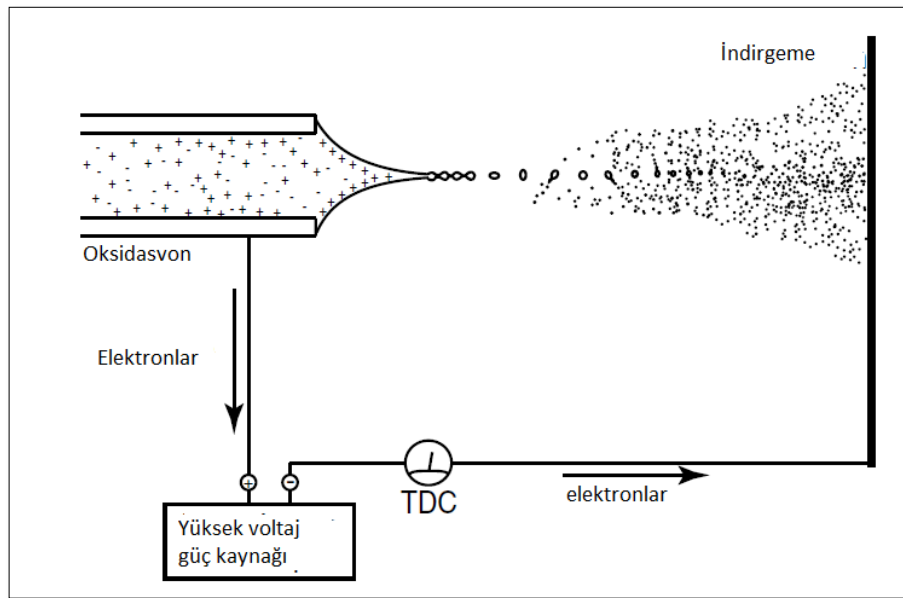


Şekil 2.17. Örnek ve iyonlaştırma yöntemine göre teknikler [30].

2.5.1.1. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) Tekniği

Elektrospray iyonlaştırma tekniği ilk olarak, Dole ve arkadaşları tarafından 1968’de ilk defa kullanılmıştır. Fakat kütle spektrometresi (quadropoly kütle analizi) ile birleştirilmesi 1984 yılında Yamashita ve Fenn tarafından yapılmıştır. Bu durum 2002’de nobelle sonuçlanmıştır [23, 32]. Yumuşak iyonlaştırma tekniği olan ESI’de numune, polar ve uçucu bir çözeltilde çözülmekte ve 1’den 4 kV’a kadar yüksek

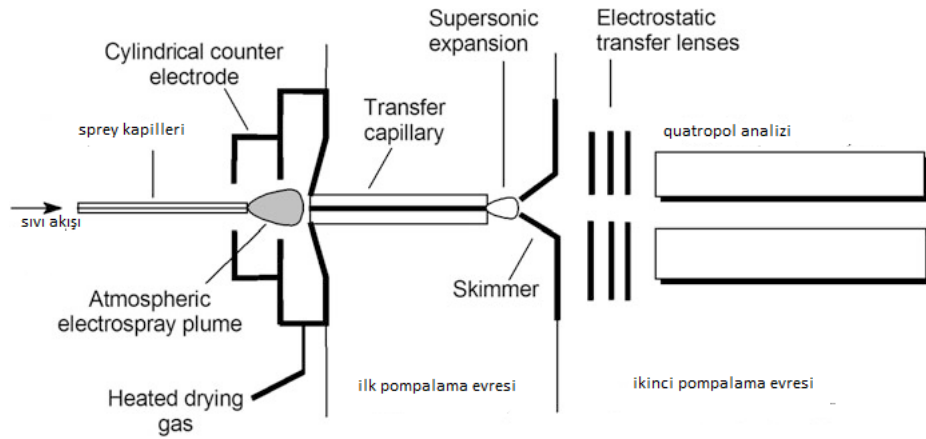
potansiyelle donatılmış iğneden geçişi sağlanmaktadır. Bu iğne ve ucu arasındaki yüksek potansiyel fark, şekil 2.18’de gösterilen Taylor konisi oluşumunu sağlamaktadır. Elektrik alan (10^6 V/m) sayesinde de yüklü parçacıklar koniden uzaklaşmaktadır. Damlacıklar (iyonik) iyonizasyon kaynağının önünden geçen sıcak (150°C ’de saatte 100 L akış olabilir) gaz akışı ya da sıcak kapiller sayesinde buharlaşma (çözücünden ayrışma) ile büzüşmeye başlamaktadır [33]. Atmosferik basınçta oluşan iyonlar ara vakum bölgesinden sonra yüksek vakumlu kütle analizör bölgesine geçiş yapmaktadır [31]. Şekil 2.18’de ESI şeması gösterilmektedir.



Şekil 2.18. ESI kaynak şeması [34].

Numunenin uygun konsantrasyonda su ya da metanol, izopropanol gibi organik çözücülerde çözülmesi gerekmektedir. Pozitif iyonizasyon modunda analit moleküllerini protonlamak için çoğunlukla formik asit veya asetik asit eklenirken; negatif iyonizasyon modunda protonlaşmayı gidermek için ise, amonyak çözeltisi ya da uçucu bir amin çözeltisi eklenmektedir. Bir çok peptid için femtomol ve attomollere kadar tespit seviyeleri olduğu için hassasiyeti yüksektir. Bu hassaslık numune konsantrasyonuna oldukça bağlıdır. Yüksek akış hızı (dakika 10-1000 mikrolitre) örneği hemen tüketeceği için, düşük akış hızını kullanmak daha iyi olacaktır ve bu da yüksek hassasiyete sebep olmaktadır. Yüksek hızda çalışırken kararlılığı yakalamak içinse ekstra ısı ya da yüksek hızlı dairesel gaz akışı sağlanması gerekmektedir. ESI

için optimum çalışma hızı ise, dakikada 2-10 mikrolitre akış olarak hesaplanmıştır [23]. 100 Da'dan daha küçük polar moleküllerden 2 MDa'dan büyük bütün virüs kütesine kadar analiz için kullanılabilir. ESI'nin en önemli özelliği, çoklu yüklü iyonların ayrışımını oluşturarak sınırlı m/z oranında çok büyük proteinlerin analizini (pH değişimi gibi durumlar yük durumunu etkiler) yapabilesidir. ESI için en ideal analiz, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ya da kapiller elektroforez ile birlikte yapılan analizlerdir [31, 35]. Küçük moleküllerin kütle spektrometresinde, ilaç geliştirmede (m/z 100–1500), metal komplekslerde, oligonükleotidlerde, DNA ve RNA'larda, oligosakkaritlerde, yüksek kütleli protein ve protein komplekslerinde (>1 MDa) kullanılabilir [30]. Şekil 2.19'da ESI tekniğinin genel şeması gösterilmektedir.

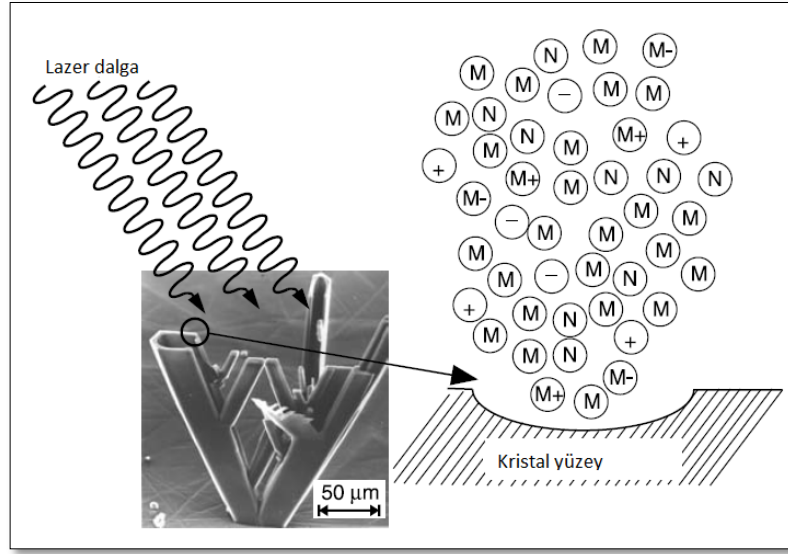


Şekil 2.19. ESI genel şeması [30].

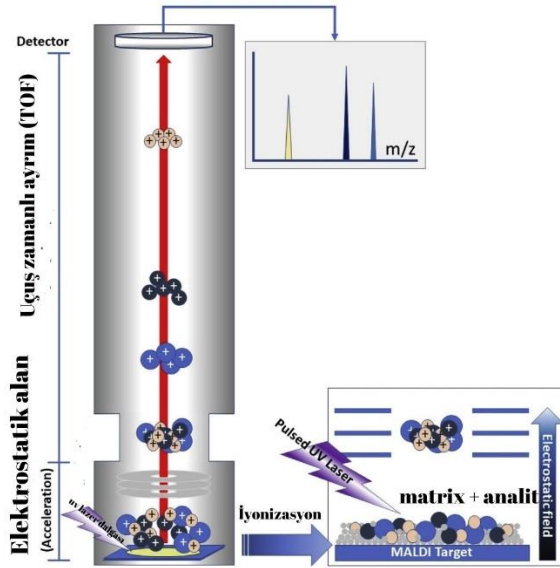
2.5.1.2. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI)

LDI (lazer deporsiyon iyonlaştırma)'nin özelleşmiş hali olan MALDI, kütle spektrometrik yöntemi, ilk olarak 1980'li yılların sonuna doğru Almanya'da Karas, Hillenkamp ve arkadaşları tarafından, aynı zamanda Japonya'da da Tanaka ve ekibi tarafından birbirlerinden haberi olmadan geliştirilmiştir ve 2002'de kimya nobelini alan Tanaka olmuştur. MALDI özellikle büyük biyopolimerlerin (200kda<x<500kda) çalışılmasında devrim yaratmıştır [23,32]. Şekil 2.21'de gösterildiği gibi genel çalışma prensibi olarak MALDI; çözücünün buharlaştırılması sağlandıktan sonra örneğe gönderilen lazer ışınları sayesinde örnekten iyonlaşan türlerin yüksek vakum etkisinde ve elektrik alanında belirli kütle analizörlerinden geçerek dedektöre ulaşması ve

bilgisayar ortamında grafik oluşumu sonucu kütle spektrum çıkarma işlemidir. Yaygın MALDI yöntemlerinde örnek; yüksek oranda ışık emici, düşük kütleli moleküllerin MALDI için kilit rol oynayan bir matrikse gömülü olduğu, analit moleküllerinden oluşmaktadır. Matriks ve matrikse gömülü analiti iyonlaştırma amaçlı, matrikse nanosaniye aralıklarla gönderilen N₂ (337nm) gibi ultraviyole (UV) veya atmosferik CO₂ (10.6µm) lazer gibi infrared (IR) ışınlarıyla birlikte matriks uyarılmakta ve analitler buharlaşmaya aynı zamanda da iyonlaşmaya başlamaktadır [23,30]. Bunun sonucunda şekil 2.20’de gösterildiği gibi genelde tek yüklü (pozitif) ama yüksek kütleli proteinlerde çoklu yük olmak üzere birbirleriyle etkileşim halinde pozitif, negatif ve nötr türler oluşmaktadır. UV ışınları için, sinematik asit türevleri gibi düşük kütle aromatik bileşikler kullanılırken; IR ışınları içinse, gliserol ve üre gibi bazı bileşiklerde başarılı olunmuştur. Sonuç olarak farklı analitler ve enerji tipleri için farklı matriksler uygulanabilmektedir. Genel olarak dikkat edilmesi gereken konu; matriks, uygun dalga boyunda ışını emebilmeli, hızlıca gaz fazına geçebilmeli ve çok fazla ısıtmadan gömülmüş analiti iyonize edebilmeli yani analitin moleküller arası kuvvetini azaltıp bir nevi çözücü görevi görmeli ve mikrokristal oluşumunu sağlamalıdır [23,31]. Genel olarak MALDI, yüksek vakumda (10⁻⁶ torr’dan küçük basınçta) ve TOF (time of flight/uçuş zamanlı) kütle analizörü ile kullanılan bir cihazdır. Farklı kütle analizörler kullanılırken vakum oranı değişebilmektedir [34]. MALDI yöntemi biyolojik moleküllerin kütle spektrometresinde oldukça kullanılmaktadır. Bunun sebeplerinden biri; büyük oranda tuz, tampon veya başka komponentler içeren karışımlarda biyomoleküllerin oldukça iyi tespit ediliyor olabilmesidir. Bundan dolayıdır ki; protein, peptit ve glikanları incelemek için bolca kullanılmaktadır. Attomol aralığında peptitlerin tanınması da oldukça hassas bir ölçüm yaptığının göstergesidir. MALDI bir yumuşak iyonlaştırma yöntemidir ve kütle aralığı hassasiyeti kütle analizörüne bağlı olmakla beraber uçuş zamanlı MALDI (MALDI-TOF) ile proteinleri 1 MDa’ya kadar analiz edebilmektedir. Yani büyük biyomolekülleri rahatlıkla analiz edebilmektedir. Glikozilasyon, fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar sonucu bozulmamış protein ve peptitleri tespit etmek mümkündür. Ayrıca uçuş zamanlı kütle analizörünün kullanıldığı MALDI türlerinde mikrobiyal tanımlama işlemi rahat bir şekilde yapılabilir [31,36,37]. Şekil 2.20, 2.21’de MALDI iyonlaşma şeması ve süreci gösterilmektedir.



Şekil 2.20. MALDI iyonlaşma şeması [31].



Şekil 2.21. MALDI-TOF kütle spektrometrik yöntem resmi [37].

Numune hazırlama sırasında yaşanacak en büyük sorun, kristalleştirme işlemi sırasında analit ve matriks molekülünün ayrılması ve homojen olmadan dağılmasıdır. Belli başlı örnek hazırlama yöntemleri vardır; “Kurutulmuş damlacık tekniği” en yaygın kullanılan örnek hazırlama tekniğidir. Bu teknikte bir kaç mikrolitre örnek solüyonu ile aynı oranda hacimle sature olmuş matriks ile karıştırılmaktadır. Matrikste de ana amacımız gelen foton başına oluşacak birincil iyon sayısını arttırmak olmalıdır

[38]. Ardından karışımdan damlacıklar MALDI plağına aktarılır ve yavaş yavaş kurutulmaktadır. Diğer bazı teknikler şu şekilde adlandırılabilir: “hızlı buharlaştırma tekniğı”, “sandviç oluşturma tekniğı”, “kurutma tekniğı”, “çözücü içermeyen teknik” [23,37].

2.5.2 Kütle Analizörleri

Kütle analizörü, kütle spektrometresinin en önemli kısmıdır. Analizörün, tüm iyonları kütle/yük oranına göre dağıtmak ve çözülmüş iyonları tek bir odak noktasına odaklamak olmak üzere 2 ana görevi vardır. Hareketli yüklü bir partikül, diğer yüklü partiküllerden; momentum, kütle, yük, kinetik enerji ve hız bakımından ayrılabilir. Kütle analizörleri de bunlardan bazılarını kullanarak, analizini uygulamaktadır. Bu temel özellikleri kullanan temel bazı analizörler; dört kutuplu kütle analizörü, uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF), dört kutuplu iyon tuzaklı kütle analizörü, lineer tuzaklı iyon kütle analizörü ve orbitrap. Kütle analizörlerinin performansını değerlendirmek için bazı kriterler bulunmaktadır. Bunlar [23,32,39];

- Kütle aralığı: Analize izin verilen m/z oranı. Bu oranın yüksek olması daha yüksek kütlede bileşiklerin analizi için uygundur.
- Çözünürlük: R ile gösterilir. İki komşu kütle iyonun ayırma yeteneğı
- Verimlilik: Tek iyonizasyon olayında oluşan iyonların fraksiyonu olarak tanımlanabilmektedir.
- Kütle doğruluğı: m/z cinsinden ölçülen hatanın kesin, doğru m/z 'ye bölünmesi ile bulunan değer.
- Hız: Birim zaman başına elde edilen spektrumların sayısı
- Hassaslık: Algılama düzeyi olarak belirtilebilmektedir.

Bunların yanında adaptasyon ve lineer dinamik aralığı parametleri de bulunmaktadır. Ayrıca Tandem MS (MS/MS) kabiliyeti, ucuz olması ve küçük boyutlarda olması da kütle analizörlerinde istenen parametrelerdendir [23]. Çizelge 2.2'de kütle analizörlerinin kıyaslanması gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Kütle analizörlerinin karşılaştırılması [27].

	Quadropol	İyon Tuzaklı	TOF	TOF Reflektör	Manyetik	FTICR	Orbitrap
Kütle Limiti	4000 Th	6000 Th	>1000000 Th	10000 Th	20000 Th	30000 Th	50000 Th
Çözünürlük	2000	4000	5000	20000	100000	500000	100000
Doğruluk	100 ppm	100 ppm	200 ppm	10 ppm	<10 ppm	<5 ppm	<5 ppm
İyon Örneklemesi	Sürekli	Darbeli	Darbeli	Darbeli	Sürekli	Darbeli	Darbeli
Basınç	10 ⁻⁵ Torr	10 ⁻³ Torr	10 ⁻⁶ Torr	10 ⁻⁶ Torr	10 ⁻⁶ Torr	10 ⁻¹⁰ Torr	10 ⁻¹⁰ Torr
Tandem MS	MS/MS	MS	-	MS/MS	MS/MS	MS	-
	Düşük Enerjili Çarpışma	Düşük Enerjili Çarpışma	-	Düşük ya da Yüksek Enerjili Çarpışma	Yüksek Enerjili Çarpışma	Düşük Enerjili Çarpışma	-

2.5.2.1. Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü (TOF)

En basit, en temel kütle spektrometrik analizör tekniği olan TOF, ilk olarak 20. Yüzyılın ortalarında tanımlanmıştır [32]. İyonların bir tüp içerisinde serbest bir şekilde 1-2 m uçuşuna dayalı bir yöntemdir. İyonları, uçuş zamanına göre yani hızına göre ayırma işlemi yapmaktadır. İyon voltaj (V_s) altında ivmelendiği zaman, kinetik enerji (E_k) formülü (eşitlik 2.5) [29];

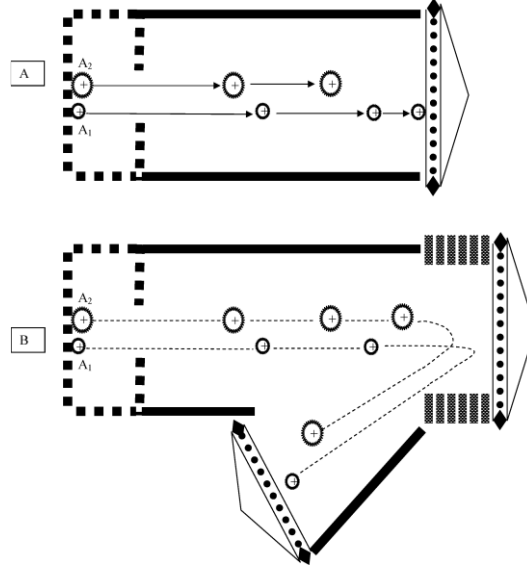
$$mV^2/2 = q V_s = ze V_s = E_k \quad (2.5.)$$

d mesafesinin uçtuğu süre ve karesi (eşitlik 2.6,7);

$$t = d/V \quad (2.6.)$$

$$t^2 = m/z(d^2/2Vse) \quad (2.7.)$$

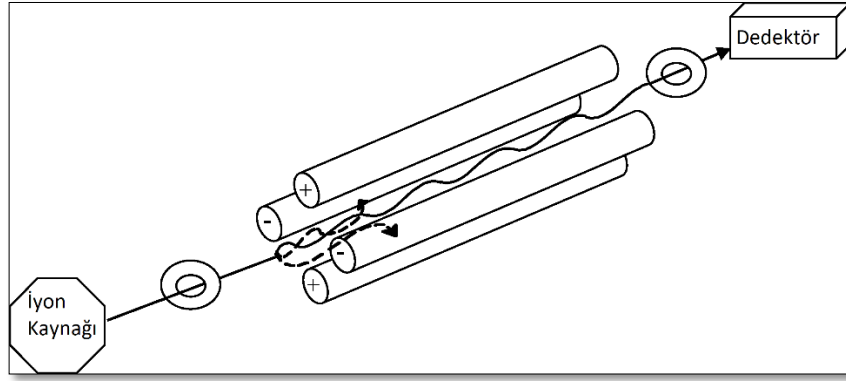
Denklemden V yerine farklı eşitlikler yazdıktan sonra uçuş süresinin karesinin m/z ile orantılı olduğu yani kütle ne kadar yüksekse o kadar geç sürede dedektöre ulaşacağı görülmektedir. İyonlar dedektöre kısa sürede art arda geldikleri için dedektörle birlikte diğer elektronik aletler de hızlı olmalıdır. TOF yüksek kütle aralığı algılama hassasiyetindedir fakat; lineer uçuş zamanlı yöntem bu hassasiyeti etkileyebilmektedir [40]. Çünkü iyonlar aynı nominal kütlede oldukları halde aynı kinetik enerjiye sahip olamayabilir ve bu durum düşük çözünürlüğe sebep olmaktadır. Bu durumu çözmek için şekil 2.22 B'de gösterilen şekilde bir reflektör modu olarak adlandırılan ve Mamry ve Shmikk tarafından 1970'lerde geliştirilen bir MALDI yöntemi kullanılmaya başlanmıştır [40, 41]. Böylece yüksek kinetik enerjili iyonlar daha uzun bir yola sahip olacak ve uçuş sürelerine göre daha ayrıntılı yani çözünürlüklü bir spektrum sağlanabilecektir. Ayrıca uçuş yolunun uzaması da bu çözünürlüğe katkı sağlayacaktır. Geleneksel uçuş zamanlı teknikten farklı olarak yansıtılmalı yöntemde fazladan 1 adet dedektör bulunmaktadır [29,32]. Şekil 22'de anlatımı resmedilmiştir.



Şekil 2.22. A) Geleneksel TOF B) Yansıtılamalı TOF, A2 iyonu dedektöre daha geç vardığı için kütle olarak A1'den büyüktür [32].

2.5.2.2. Dört Kutuplu Kütle Analizörü

Bu kütle analizörü, radyo frekansı ve voltaj etkisi altında iyonların yörüngesindeki stabilitesine dayanmak üzere şekil 2.23'de görüldüğü gibi 4 adet çubuktan oluşmaktadır ve 4000 Da ve altı moleküllerin analizi için uygundur. Çubukların bir ucuna iyon kaynağı, diğer bir ucuna ise dedektör yerleştirilmektedir. Eğer herhangi bir direkt voltaj uygulanmazsa iyonlar geniş bir kütle aralığında kutuplardan geçebilmektedir. Analizöre doğru 5 kV elektrik alan ile gönderilen iyonlar, eğer bir voltaj uygulanırsa karşıt polaritenin çubuklarında deşarj olacakları için herhangi biri geçememektedir. Fakat aynı anda hem dc hem de rf gerilimi uygulanırsa sadece belirli kütleli iyonlar geçebilecektir. Yani pozitif yüklü bir iyon negatif yüklü çubuk yönünde hareket edebilecektir. Polarite değiştirildikten sonra da iyon çubuğa çarpmadan önce hareket yolunu değiştirebilecektir. Böylece iyonlar karmaşık yörüngesel salınım geçirerek filtreleme yapılabilecektir [32]. Diğer kütleli bir nevi istenmeyen kütle iyonları çubuklarda deşarj olabilecektir. Bunun sonucunda dört kutuplu kütle analizörü kütle filtresi uygulanmış olur. Bu analizör türü düşük kütle çözünürlüklüdür [23,29]. Şekil 2.23'de dört kutuplu analizörlerin çalışma prensibi gösterilmiştir.

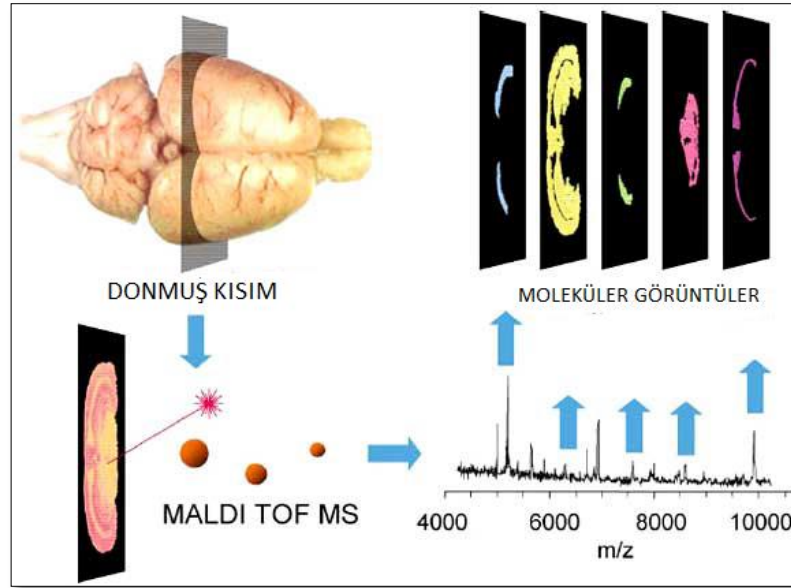


Şekil 2.23. Dört kutuplu analizör [32].

2.6 MALDI GÖRÜNTÜLEME

Kütle spektrometre kavramı ilk olarak 90'lı yılların başlarında denenmeye başlanmıştır [43,44]. Doku bölümlerinin araştırılması için kullanılan analitik bir yöntem olan MALDI görüntüleme ise, ilk olarak Gusev ve arkadaşları tarafından 400-1200 Da kütleinde (şimdilerde 1000000 Da'a kadar) peptitlerin görüntülerini 1995 yıllarında almalarıyla başlamıştır [42]. Bu görüntüleme yönteminde de genel olarak MALDI-TOF (pozitif iyon yansıtma modu) kullanılmaktadır [45]. MALDI görüntüleme temelde; örnek hazırlama, matriks uygulaması, ölçüleme, veri analizi ve görüntü oluşturulması kısımlarından oluşmaktadır [46]. MALDI görüntüleme yönteminin en iyi yanı, hücreleri histolojik olarak araştırmamıza olanak sağlamasıdır. Yani MALDI görüntüleme, dondurulmuş dokulardan ince kesit alınarak mikroskop ile kütle spektrometresinin birleştirilmiş hali denebilmektedir [47]. Örnekle; kanser gibi hastalıkların tanısı için bir biyobelirteç belirlemede ve dokunun hangi kısımlarının kanserli olduğu mikroskop altında pataloglar tarafından tanı konulduğu gibi bu yöntemle de anlaşılabilir. Bunda da en önemli post-translasyonel modifikasyon olan glikozilasyonun önemi çoktur. Burada oluşan glikoprotein veya lipid haritalamasına göre kanserli ve sağlıklı doku haritası çıkartılabilir. Ayrıca parmak izi analizinde, dokuların profillenmesinde ve ilaç iletiminde kullanılabilir. Dezavantaj olarak, siyalik asitlerdeki negatif yükten kaynaklı iyonlaşma veriminin düşük olması sorun çıkarabilmektedir. Bunu önlemek için; amidasyon ve esterifikasyon gibi siyalik asitlerinin kararlılığının artırma teknikleri uygulanabilmektedir [45]. MALDI haricinde antikorlar ile boyama yöntemleri de

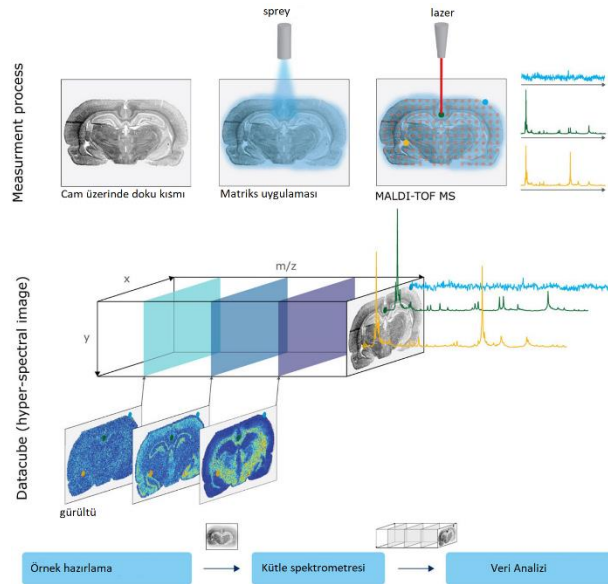
bulunmaktadır fakat bu tip yöntemlerin de sınırlılıkları bulunmaktadır [45]. MALDI görüntüleme yöntemiyle birden fazla analit türleri analiz edilebilmektedir. Örneğin aynı dokudan protein ve lipitleri ayrı ayrı analiz edip profillemeye yapılabilmektedir [48]. Alınan örnekler (örnek sonucunu şaşırtacak biyolojik tepkimelere yol açmaması için) kesinlikle düşük sıcaklıkta (-20, -80) muhafaza edilmelidir. Ayrıca örnekler parafinle kaplanabilmektedir. Çeşitli enzimatik ve kimyasal süreçlerden geçtikten sonra cihaza yüklenmekte, veriler ve görüntü bilgisayar ekranına aktarılmaktadır. Çözünürlüğü etkileyen iki unsur, matriks kristallerinin doku yüzeyinde birikmesi ve çapı, bir diğeri ise gönderilen lazer çapıdır (ortalama hücre çapı 20 mikrometre olduğu düşünülerek) [42]. Şekil 2.24’de MALDI görüntüleme aşamaları resmedilmiştir.



Şekil 2.24. MALDI görüntüleme aşamaları [42].

MALDI görüntüleme örneği hazırlama tekniği toparlanırsa; örnek, taze veya dondurulmuş olmalıdır. Dokunun mikrotom cihazı ile 6-20 mikrometre bandında kesilmesi, bozulmaması için dokunun parafinlenmesi (FFPE, fakat formaldehit fiksasyonu formaldehit yüzünden uyarılma sonucu protein çağraz bağlanma nedeniyle limitleme yapabilmektedir. Bunu çözmek için enzimler tarafından doku üzeri protein parçalama işlemi yapılmaktadır) ve 1 saatte 60 derecede ITO (iletkenliği arttırmak ve saydam olması) camlara gömülmesi gerekmektedir. İyonlaşma verimliliği için doku kalınlık faktörü önemlidir. Yüksek moleküler ağırlıklar için 2-6 mikrometre tavsiye

edilirken, düşük moleküler ağırlıklar için 6-20 mikrometre kalınlık tavsiye edilmektedir. Daha sonra ksilen ve etanol gibi kimyasal etkilerle parafinin yıkanması sonucu, dokudan uzaklaştırılması yapılmaktadır. Ayrıca arkada lipit ve tuzlar tarafından yapılacak gürültü etkileri kaldırılmış olur. Eğer lipitler üzerine bir çalışmaya parafin kaplama kullanılmaz. Direkt kütle/yük oranı 1000'den küçük olarak başlatılabilir [46,49]. Glikan analizlerinde dokulardan glikanların salınması için PNGase F enzimi dokuya püskürtülür (negatif kontrol amaçlı dokunun belli kısmı enzimden korunur) ve 36-38 °C 1 gün bekletilmektedir [45]. (Matriks örneğe püskürtüldükten sonra analiz gerçekleştirilmektedir [42, 50]. Matriks hazırlamak içinse 3 yaygın yöntem vardır; ilki, manuel olarak yapılan püskürtme işlemidir. Bu yöntem uygun oda koşulları ve yetenek/tecrübe istediği için önem arz etmektedir. İkincisi ise; ilk yöntemin otomatik halidir. 3. yöntem ise çözücü gerektirmeden matriksin düşük basınç ve yüksek sıcaklık altında örnek üzerine bırakılmasıdır [46]. Şekil 2.25'de MALDI süreci gösterilmektedir.



Şekil 2.25. MALDI görüntüleme; örnek hazırlama, kütle spektrometrik işlem, veri analizi [51].

2.7. GLİKAN ANALİZLERİ İÇİN ÖRNEK HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Protein glikozilasyonu sonucu oluşan glikoproteinleri ve şeker kısmı olan glikanlar tezin önceki sayfalarında anlatılmıştır. Bu bölümde glikanları, analize hazırlamak için

ne tür hazırlıklar yapıldığına değinilecektir. Bunlar *N*-glikanların önce salınımları, daha sonra etiketlenmesi ve en sonunda da saflaştırılmasıdır. Bahsedilen işlemler genel olarak *N*-glikan türevlendirmesi olarak adlandırılabilir. Türevlendirme işlemleri için de; indirgeyici aminleme, permetilasyon, Michael ekleme, hidrazid etiketleme yöntemleri kullanılabilir [52].

2.7.1. *N*-Glikanların Salınımı

N-glikanlar kompleks yapıda oldukları için daha iyi analiz edilebilmek amacıyla protein çekirdeklerinden ayrılmaktadırlar. Salınmış glikanlar genelde florasan maddeleriyle etiketlenir ya da metilleme işlemi uygulanır ve en sonunda HPLC, CE, MALDI ya da ESI-TOF kullanılarak analizi yapılmaktadır (glikopeptit karışımli glikan analizleri için MS/MS) [53]. *N*-glikanların salınım işlemi temelde 2 şekilde olur, enzimatik ve kimyasal olarak. Kimyasal için kullanılan yöntem genelde hidrazinolizdir (β -eliminasyon yoluyla). Etiketleme için bozulmamış uç bırakma avantajına sahip hidrazin (*N*-glikanlar için 95 derece sıcaklık gerekli), burada glikanlarla aminoasitler (asparjin) arasındaki amid bağlarını yıkmaktadır. Diğer yandan, protein bütünlüğünde bozulmalar yaşanması ve farklı ürünler ortaya çıkması ve toksiklik oluşturması dezavantajları olarak kabul edilmektedir. Toksikliğe neden olan hidrazini gidermek içinse karbon malzemeler kullanılmaktadır [54]. O-glikanların salınımında, kimyasal yöntem metodu düzgün ayarlandığında verimlidir [52,55]. Enzimatik salınım içinse en çok kullanılan yöntem, PNGase F ya da *N*-glikanaz F enzimi olarak bilinen asparajin amidazdır (GlcNAc ve asparjin arasındaki bağı koparan glikoamidazdır) ve bu enzim *N*-glikanların salınmasını sağlarken diğer glikanlara ve proteinlere çok fazla etkisi yoktur. Ayrıca bu işlem sonucu asparajin kalıntısı aspartik aside deamine olmuş olur. *N*-glikan tiplerini (hibrit, yüksek mannozlu, karmaşık) protein glikozilasyonu sonucu oluşan glikoproteinlerden kolay bir şekilde bıraktırması, bu enzimi değerli kılmaktadır. Glikanları glikoproteinlerden tamamen ayırmak yani verimi arttırmak için (enzimin etki alanını arttırmak için) glikoproteinleri parçalamak gerekmektedir. Bunun için dithiothreitol (DTT) ile indirgeme işleminden sonra, iyodoasetamid ile alkilasyon sonucu protein kılıfı açılabilir ve daha ayrıntılı analizler yapılabilir. Bazı fukoz şekerlerini çözmek için (özellikle bitki ve böceklerde) kütlece PNGase-F enziminden büyük PNGase-A

enzimi de kullanılmaktadır [53,55]. Detaylı glikan salınımı için (protein yıkımı) 1 gecedan fazla beklenmesi gerekebilmektedir. Bu beklemei azaltmak için mikrodalga uygulaması ve yüksek basınç gibi teknikler uygulanabilmektedir [54].

2.7.2. N-Glikanların Etiketlenmesi

N-glikanların daha iyi tespiti için kromofor ve floroforlarla etiketlenmesi sağlanmaktadır. Uygulanacak etiketler sayesinde HPLC, CE ve kütle spektrometrik analizlerde yüksek ayrılma hassasiyeti görülmektedir. Glikanlar indirgeme etkisi olan aminleşme işlemiyle indirgeme uçlarından etiketleme işlemi yapılabilmektedir. Sodyum siyanoborohidrid (toksik riski) ya da borondimetil amin gibi indirgeyici ajanların ana amino gruplarıyla glikanların aldehit grupları birleşerek Schiff baz tipi veya imin oluşur ve indirgeme işlemi de gerçekleşmiş olur. Ayrıca 2-pikolin boron ajanı (sodium siyanoborohidridin toksitsiz alternatifi) etiketlemede alternatif indirgeyici ajan olarak kullanılabilir. Bu reaksiyonlar genelde asetik asit içeren dimetil sülfoksitte gerçekleşmektedir. Alternatif olarak da tetrahirdofuran ve metanol yaklaşımı sunulmuştur [52]. Bahsedilen indirgeyici aminleme işlemleri için en sık kullanılan reaktifler (etiketler) ise; fenilhidrazin, 2-aminopiridin (PA), 2-aminobenzamid (2AB), 2-aminobenzoik asit (2AA), 2-aminonaitalen trisülfonik asit (ANTS), 1-aminopirin-3,6,8-trisülfonikasit (APTS, glikom haritalama ve glikan standartlarında kullanılır), 4-aminobenzoik asit etil ester (ABEE, hidrofobikliği artırır), 2-aminoakridon (2-AMAC, ESI MS/MS'de kötü, MALDI'de iyi), fenilhidrazin (PHN, siyalik asit kaybı minumdur). HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi)'de iyi olan PA ile boyanmış glikanlar pozitif iyon moddaki kütle spektrometresi ile yüksek hassasiyette iken 2-AB ise, negatif yük yokluğu olduğu yerde kromatografik (özellikle HILIC) analizlerde iyidir. 1 negatif yük taşıyan 2-AA ise negatif mod MALDI yönteminin yanı sıra HPCL ve Elektroforez (CE) yöntemlerinde kullanılmaktayken, 3 negatif yük taşıyan APTS, MALDI'de iyi değildir ama kapiller jel elektroforezi ve elektroforezde iyidir. [52,54]. Etiketlemenin MALDI ve ESI analizlerindeki avantajı, hassasiyeti ve termal stabiliteyi arttırmaktır. Benzer şekilde permetilasyon işlemi de bu amaçla yapılmaya başlanmıştır. Burada amaç; glikanların hidroksil, amino, karboksil gruplarındaki termal stabiliteyi arttırmaktır [53]. Burada; glikanların hidroksil, amino, karboksil gruplarındaki hidrojenler,

hidrofobik derivasyonlu ürün ortaya koymak için metil gruplarıyla değiştirilirler. Böylece siyalik asit grupları stabilize edilmiş olur [53, 56]. Bir çok laboratuvarda yapılan deneylere göre de metal iyodid (1 dakikadan az sürede, pikomol seviyede permetilasyon) ile yapılan permetilasyonlar en etkili yöntem olarak kabul edilmiştir. Etiketleme yöntemlerinde ayrıca hidrazid etiketleme işlemi de kullanılmaktadır. Bu işlemde hidrazid uçlu etiketle glikanlar reaksiyona girer ve etiketlenir. Bu yöntem kromatografik yöntemin kullanıldığı kütle spektrometrik analizlerde ya da biyomoleküler etkileşimleri görmek için kullanılmaktadır [54,55]. Etiketleme ve glikanların analizleri genel olarak saatler sürmektedir. Geçen uzun saatleri indirgemek ve hassasiyeti arttırmak için bir tertiar amin, N-hidroksisüksinimiz (NHS), karbamat reaktif gruplarından oluşna RapiFlour-MS (RFMS) etiketi geliştirilmiştir. Bu yöntemle düşük örnek miktarlarıyla yüksek hassasiyetle analiz yapılabilmektedir [57].

2.7.3. N-Glikanların Saflaştırılması

Türevlendirme ve etiketleme işlemlerinden sonra kompleksliği gidermek amacıyla *N*-glikanların kesinlikle saflaştırılması gerekmektedir. Bunun için de kütle spektrometrik tekniklerle suyu seven (hidrofilik), boyut ve anyon değişimine dayalı kromatografik tekniklerin birlikte kullanılması gerekmektedir [58]. Daha doğrusu kromatografik tekniklerin kütle spektrometrik tekniklere entegre edilmesi gerekmektedir. Normalden çok olan tuzlardan sonra, etiketleme işlemi için kullanılan etiketlerin fazlalığını gidermek gerekmektedir. Bu nedenle bu işlemleri uygulayabilmek için bazı teknikler kullanılır; katı faz ekstraksiyonu (SPE, büyük örnek gruplarında tercih edilir), sıvı-sıvı ekstraksiyonu, jel filtrasyonu, kağıt kromatografisi ve çöktürme işlemleri kullanılmaktadır. Katı faz ekstraksiyon ve kağıt kromatografisi, hidrazid etiketleme ve indirgeyici aminleme işleminden sonra kullanılırken; sıvı-sıvı kromatografisi ise permetilasyon ve Micheal eklemesi sonrası uygulanması tercih edilmektedir. SPE yönteminde işlem görmüş, türetilmiş glikanları saflaştırmak amaçlı bazı SPE fazları bulunmaktadır. Bunlar; ters faz (RP), grafitlenmiş gözenekli karbon (PGC, dakikada 0.6 mikrolitre akış ile düşük kütleli *N*-glikanların taranmasında 10 kat hassasiyet artışı.) ve HILIC'dir. Aminlenmiş glikanlarda kullanılan en verimli tekniklerden biri olan HILIC (RA, 2-AA, 2-AB, APTS) glikanların hidrofilikliğine ve hidrofobikliğine dayalı saflaştırma işlemi uygulamaktadır. Suyu az seven etiketler çıkartılmaktadır.

Fakat HILIC uygulanması fazla zaman alabilmektedir. Bu yüzden “mikroçip sıvı kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılarak ayrılma hızı arttırılabilir ve böylece süre kısaltılabilir” düşüncesi ortaya atılmaktadır [52–54,59-60]. Ayrıca lektin affinitı kromatografisi (LAC) de glikan yakalamada kullanılabilir [61]. Glikan ayırma – saflaştırma işlemleri için elektroforez (CE) ve mikroışkan kapiller elektroforez (MCE) tekniği de kullanılabilir. Hatta yüksek basınçta ayırma işleminde oluşan soru işaretlerinden arınmış şekilde hassasiyet ve ayırma sağlayabilmektedir. Bunun için öncelikle şekerlerin negatif yüklü bir etiketle etiketlenmesi gerekmektedir. Daha sonra 1 gece 37 derece sıcaklıkta bekletilmektedir (siyalil olmasaydı bir kaç saat 55 derecede bekletilecektir) [60].

2.8. N-GLİKANLARIN KROMATOĞRAFİK AYRILMALARI

Kromatografi, kütle spektrometrik analizlerini detaylandırmak için uygulanan ayırma işlemidir. Moleküler ağırlık (ağırlar daha geç ilerler) gibi çeşitli parametlere göre uygulanan bu işlemler 3 ana kısımdan oluşmaktadır. Bunlar; sabit (durağan) kısım, hareketli kısım ve ayrılan moleköl (uygulama amacı). Bu kısımların bağlantılı çalışmasıyla kromatografik tekniklerle; aminoasit ve karbonhidrat gibi küçük kütleli moleköllerin ayrışması, tanınması verimli bir şekilde gerçekleştirilir. Protein gibi büyük kütleli moleköl için ise afinite kromatografisinin daha verimliği olduğu düşünölmektedir. Anlaşıldığı gibi birden fazla kromatografik yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler maddelenirse [62,63];

- İyon-değişimli kromatografisi
- Jel-geçirgenliği kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi
- Hidrofobik (suyu sevmeyen) etkileşimli kromatografisi
- Kolon kromatografisi
- Afinite kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
- Kağıt kromatografisi

2.8.1. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (HILIC)

HPLC'nin bir modu olan HILIC, polar ve hidrofilik (su ile bağ yapabilme yeteneği) bileşiklerin ayrımını yapmak, ayırmak için kullanılan yüksek performanslı bir tekniktir. Ters faz tipinde ayırmanın aksine normal faz tipinde ayırma olmasına rağmen, ters faz tipinde ayırma araçlarını kullanmaktadır. Bunlar; hidrofilik kolon, su, tampon, suyla karışabilen organik çözücüdür. ESI-MS ile yüksek performans sağlayan HILIC, elüsyon olarak ters fazlı sıvı kromatografisine göre ters çalışmaktadır. Normal faz sıvı kromatografisinde, sabit faz hareketli fazdan daha polardır. Mobil fazın sahip olduğu polarite azaltıkça, tutunma artar ve sonuç olarak polar olanlar polar olmayanlardan daha güçlü tutunmaktadır. Bu durum (normal fazda gerçekleşen), ters faz sıvı kromatografisinde tam tersidir. HILIC'de sabit faz olarak; silica, amino ve siyanolar kullanılır. Mobil faz içinse ters fazla benzer bileşenler kullanılmaktadır. Sonuç olarak HILIC, ters – normal faz sıvı kromatografisi ve iyon kromatografisinin birleşimi olarak düşünülebilmekte ve çok yönlü fazların ayrımında çok etkili olabilmektedir [64].

Uygulama alanları ise;

- Vitamin, ya da karbonhidratların analizi
- Protein glikozilasyonun karakterize edilmesi
- Polar moleküllerin ayrıştırılması
- LC/MS polar bileşiklerin analizi
- Yüklü bileşenlerin ayrılması [64].

2.9. N-GLİKAN YAPILARININ TANIMLANMASI (FLORESANS TABANLI ETİKETLEME)

N-Glikanları tanımlamak için çeşitli etiketleme reaksiyonları gerçekleşmektedir. Bu şekilde, glikoproteinlerden ayrılan *N*-Glikanlara floresans özellik kazandırılarak analizlerde tespit edilebilmektedir. Yüksek oranlı tespit edilebilmelerine ek olarak; hem indirgeme sonucu daha kararlı hale gelirler hem de artan hidrofiliklikten dolayı saflaştırma işlemlerinde yüksek verimlilik göstermektedirler. İndirgeme amaçlı etiket reaktifleri için çeşitli etiketler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; 2-aminobenzamit,

2-aminobenzoik asit (2-AA), 2-aminopiridin, 2-aminonaftalen trisülfonik asittir. Negatif yük taşıyan 2-AA, bu özelliği sayesinde glikanı çok yönlü hale getirir ve HPLC, kapiler elektroforez gibi çeşitli kütle spektrometrik analizlerde nötr analizlere imkan tanırken, MALDI analizlerinde de pozitif ve negatif modda analizlere imkan tanımaktadır [67-70].

2.9.1. N-Glikanlar İçin Kütle Spektrometrik Analizler

Glikoproteinlerden, PNGase-F enzimi ile ayrılan *N*-Glikanların kütle spektrometrik analizlerinin yapılabilmesi için sıklıkla, MALDI ve ESI yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle MALDI-TOF-MS, nötral oligasakkaritler ve negatif yüklü *N*-Glikanların analizleri için uygun bir yöntemdir. Tabii ki matriks uyumuna da dikkat edilmelidir (Düşük matrikste *N*-Glikanların kristallenme kabiliyetinden dolayı sık kullanılan, 2,5-dihidrobenzoik asit (DHB)). 2-AA gibi floresans temelli etiketlemelerle birlikte çalışıldığında ise son derece uygun bir yöntemdir [67-70].

2.10. BÖBREK KANSERİ

Boşaltım sisteminin ana parçası olan böbrek, omurganın sağında ve solunda olmak üzere toplamda normal insan vücudunda 2 adet bulunmaktadır. Çoğu organ, doku ve kemiklerde olduğu gibi böbrek organında da kanser vakaları görülmektedir. Genel olarak, “böbrek kanseri” ya da “renal karsinom” olarak adlandırılan böbrek kanserinin çeşitli alt tipleri vardır. Bunlar; renal hücreli karsinom (RCC), Wilm’s tümörü ve epitel hücreli kanseri ve böbrek sarkomu/adenoma/onkositomu/anjioyomiyolipomudur. Aralarında en sık görülen böbrek kanser tipi ise ortalama %85-90 ile renal hücreli böbrek kanseridir. En çok görülen tip olan RCC; berrak hücreli karsinom, papiller karsinom, kromofob RCC ve renal onkositom olmak üzere çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır. RCC, erkeklerde ve şehirde yaşayanlarda daha çok görülmektedir. Böbrek kanserlerinin teşhisi ise; USG, tomografi, MR, sintigrafi, PET, biyopsi gibi yöntemlerle yapılabilmektedir. Böbrek kanserinin tedavisi ise; radyasyon tedavisi, kemoterapi ya da hormon tedavisi ile gerçekleştirilmektedir [65,66].

BÖLÜM 3

3.1. KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan FFPE renal karsinomlu dokular Karabük Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji biriminden alındı. Metanol, asetonitril, etanol, ksilen Sigma-Aldrich firmasından alındı. DL-ditiyotriol (DTT), trifloro asetik asit (TFA), DMSO, asetik asit (CH₃COOH) Merck'den alındı. 2-amino benzoik asit (2-AA), sodium dodesil sülfat (SDS) ve sodyüm klorür (NaCl) Sigma-Aldrich'den alındı. Peptit-N-glikozidaz F (PNGase F) enzimi Promega firmasından, 2,5-dihidroksi benzoik asit (DHB) Bruker Daltonics'den alındı. Çalışmanın tamamında kullanılan deiyonize su ise Expe-Ultrapure su arıtma sistemleri ile elde edildi ve kullanıldı.

3.2. DOKULARDAN PARAFİNİN UZAKLAŞTIRILMASI

Kanserli ve Kontrol olmak üzere yaklaşık 39 adet böbrek dokusu, Karabük Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi ilgili birimden (patoloji) alındı. Çalışma retrospektif olarak dokuların toplanması ile gerçekleştirildi. Aynı zamanda çalışma girişimsel olmayan etik kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik Kurul Karar No: 2019/117, Ek1). Ependorflara alınan dokular ilk olarak 60°C'de 30 dakika inkube edildikten sonra sırasıyla, ksilen ile 2 kez yıkandı. Ortalama 5 dakika 600 RPM'de 25 derecede inkube edilip ksilen uzaklaştırıldıktan sonra, %100 etanol ile yıkandı. Ksilen (1 mL) ve etanol (1 mL) ile 2'şer kez yıkandıktan sonra dokulardan sıvılar uzaklaştırıldı ve 45 derece sıcaklıkta 5 dakika boyunca SpeedVakum konsantratör cihazı ile kurutuldu. Gerçekleştirilecek işlemlerin uygun pH seviyesinde kalması için 0.1 M Tris-HCl tamponu hazırlandı ve pH 8'e ayarlandı. Bu işlemlerden sonra protein yapısını birincil seviyeye getirmek için, DTT hazırlanıp her örneğe eklendi (0.1 M DTT). Son olarak da sonikasyon (1.5 saniye işlem süresi, 3 saniye bekleme süresi) işlemi uygulandı.

3.3. PROTEİNLERİN EKSTRAKSİYON İŞLEMİ

Bu işlem için ağırlıkça %16 olacak şekilde proteinlerin ekstraksiyonu için SDS hazırlandı. Sonikasyon işlemi yapıldıktan sonra dokulara SDS, son derişimi %12 oluncaya kadar ilave edildi ve 99 °C’de ortalama 1 saat boyunca 600 rpm’de inkube edildi. Daha sonra protein içeren süpernatantın daha iyi alınması için dokular, 2000 rcf’de 25 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonra ise her doku üzerinden bir miktar (0.15 mL) alınıp ayrı mikro santrifüj tüplerine koyuldu. Bu işlemden sonra her bir ependorf kaplara metanol, kloroform ve dH₂O eklendi (0.6 mL metanol, 0.15 mL kloroform, 0.45 ml dH₂O). Ependorfdaki sıvıların daha iyi karışabilmesi için 3-4 saniye vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra 14000 rcf’de 5 dakika santifuj yapıldı. Bu işlem bittikten sonra ependorflardaki peletin üzerindeki sıvı pipet ile uzaklaştırıldı. Daha önce yapıldığı gibi tekrar metanol (0.45 ml) ilave edildi, vortekslendi ve tekrar santifüj edildi (12 dakika 14000 rcf). İşlem bittikten sonra sıvıların hepsi uzaklaştırıldı ve tamamen kurutulmak (proteinler) üzere SpeedVacum cihazında örnekler 45°C 30 dk tutuldu.

3.4. N-GLİKAN SALINIM İŞLEMİ

Protein ekstraksiyonunun aksine %16 yerine, 25 µL ağırlıkça %1 SDS örneklere eklendi. 20-30 saniye vorteksleme işleminden sonra örnekler, 5 dakika boyunca 600 rpm’de inkube edildi. Daha sonra her örneğe 12.5 µL %2 Igepal-CA360 ilave edildi. Yine örneklere 12.5 µL ilave etmek üzere 5 x PBS hazırlandı. N-glikanların proteinden ayrılması için ise, 1 µL (1U) kadar PNGase F (Peptide-N-Glycosidase) enzimi tüm örneklere eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında örnekler bekletildi.

3.5. 2-AA ETKİKETLEME İŞLEMİ

2-AA etiketleme işlemi, glikanların verimli şekilde tespit edilebilmesi için kullanılan bir etiketleme ajanıdır. Bu etiket sayesinde kütle spektrometrik ve kromatografik analizlerde glikanların tespit edilmesi kolaylaşmaktadır. Böbrek dokularındaki proteinlerden salınan N-glikanların etiketlenmesi için; 2-AA (0.048g) ve NaCNBH₃ (0.063g) tartıldı ve DMSO: Asetik Asit, 10/3, v/viçerisinde çözdürüldü. Daha sonra

örneklere her birinden 25 µL olacak şekilde teker teker eklendi. Sonrasında örnekler etüvde 2 saat boyunca 65°C inkübe edildi.

3.6. SELÜLOZ İÇEREN KATI FAZ EKSTRAKSİYON KARTUŞLARI İLE 2-AA ETKİKETLİ N-GLİKANLARIN SAFLAŞTIRILMASI

Selüloz temelli katı faz ekstraksiyon kartuşlarının hazırlanması için ilk olarak 0.8 g selüloz dH₂O içerisinde hazırlandı. Oluşan süspansiyondan daha sonra 0.2 ml selüloz içeren süspansiyondan alınarak ependorflara aktarıldı. Selüloz içeren malzemeleri ilk olarak 2'şer defa 0.5 ml önce dH₂O daha sonra da %85 ACN çözeltisi eklendi, 4000 rpm'de santrifuj edildi. Toplam 4 adım süren bu aşamanın her adımının sonunda 4000 rpm santrifuj yapıldı ve üstte kalan faz atıldı. 2-AA etiketlemiş dokulardan, örneklerden 0.075 ml alınıp 0.425 ml %100 ACN ile farklı ependorflarda karıştırıldı. En az 20 dakika 600 rpm'de inkübasyon sonrası örnekler, sırasıyla sep-packlere aktarıldı. Aktarma işleminden sonra, sırasıyla; %85 ACN %1 TFA, %85 ACN ile 3'er kez yıkandı (1 ml). En son aşama olarak da, 0.75 ml dH₂O ile elüsyon aşaması uygulandı. Daha sonra PGC ile saflaştırma işlemine geçildi.

3.7. GÖZENEKLİ KARBON KATI FAZ EKSTRAKSİYONU İLE 2-AA ETİKETLİ N-GLİKANLARIN SAFLAŞTIRILMASI (CARBON SPE)

Örneklerden tuz gibi gürültü oluşturabilecek maddelerden, bileşenlerden arındırmak için carbon SPE'ler ile saflaştırma işlemi yapıldı. Öncelikle 2g GPC (Graphitic Porous Carbon) 20 ml dH₂O karıştırıldı ve her bir kartuşa 0.5 mL olacak şekilde ekleme yapıldı. Daha sonra kartuşlar, 2 kez ml % 80 ACN ile, 3 kez 1 mL %0.1 TFA ile yıkandı. Daha sonra örneklere 0.75 µL TFA eklendikten sonra örnekler, sırayla kartuşlara yüklendi. 3 kez % 0.1 TFA ile yıkandıktan sonra son adım olarak, daha önce 39 adet hazırlanan ependorflara 0.75 mL, % 0.1 TFA içeren % 80 ACN ile elüsyonları yapıldı. Örnekler analize gitmeden önce SpeedVacum ile bir gece kurutuldu 25 µL suda çözüldükten sonra MALDI-MS ile analizleri gerçekleştirildi.

3.8. MALDI-MS ANALİZLERİ

2-AA etiketli *N*-glikanların MALDI-MS analizi, SmartBeam 3D lazer teknolojisi içeren bir RapiFlex MALDI-TOF/TOF-MS/MS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırılmış numune çözeltileri (her biri için 1 µL) doğrudan MALDI hedef plakası üzerinde spotlandı ve kurumaya bırakıldı. Örnek noktaların her biri eşit hacimde (yani 1 µL) %50 Su ve % 50 ACN kullanarak hazırlanan 5 mg mL⁻¹ DHB [2,5-dihidroksibenzoik asit (2,5-DHB)] ile kaplandı. Spektrumlar, negatif iyonizasyon modunda 20 kV hızlanma potansiyelinde ve refletron modu kullanılarak 1000–4000 Da kütle aralığında elde edildi. Kristalize numuneler 2000 Hz frekansta toplam 8000 lazer toplanarak analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.9. VERİ ANALİZLERİ

Elde edilen MS ve MS/MS spektrumları Protein Scape V4 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) yazılımına aktarıldı. Sonrasında GlycoQuest yazılımı kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Tespit edilen *N*-glikanların bir listesi oluşturulmuştur. Bu listede yer alan glikanların alan bilgileri FlexAnalysis (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) yazılımı kullanılarak ekstrakte edilmiş ve toplam alan normalizasyon yaklaşımı kullanılarak her tespit edilen *N*-glikanın göreceli bolluğu hesaplanmıştır. FlexAnalysis programında; sinyal ve gürültü eşiği 3, maksimum pik sayısı 500 olacak şekilde pikler tespit edildi ve ekstraksiyon işlemi öncesinde 2-AA etiketli *N*-Glikan kütleleri kullanılarak (H3N2F1-AA, H5N2-AA, H3N4S1-AA, H5N4-AA, H5N4F1-AA, H6N5F1-AA) her bir spektrumun iç kalibrasyonu yapıldı.

3.10. İSTATİSTİK ANALİZLER

Renal karsinomlu dokuların analizlerinde GraphPad Prism programı kullanıldı. Glikan grupları ve kombinasyonları temelinde kanserli ve komşu kontrol yani sağlıklı dokular arasında farklılık olup olmadığını tespit için Çoklu Klasik T testi yöntemi (kanserkontrol kıyaslaması, örnek sayısı > 30 ve normal dağılım için ideal) ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Kanserli ve kontrol dokular arasında glikanların biyobelirteç olarak

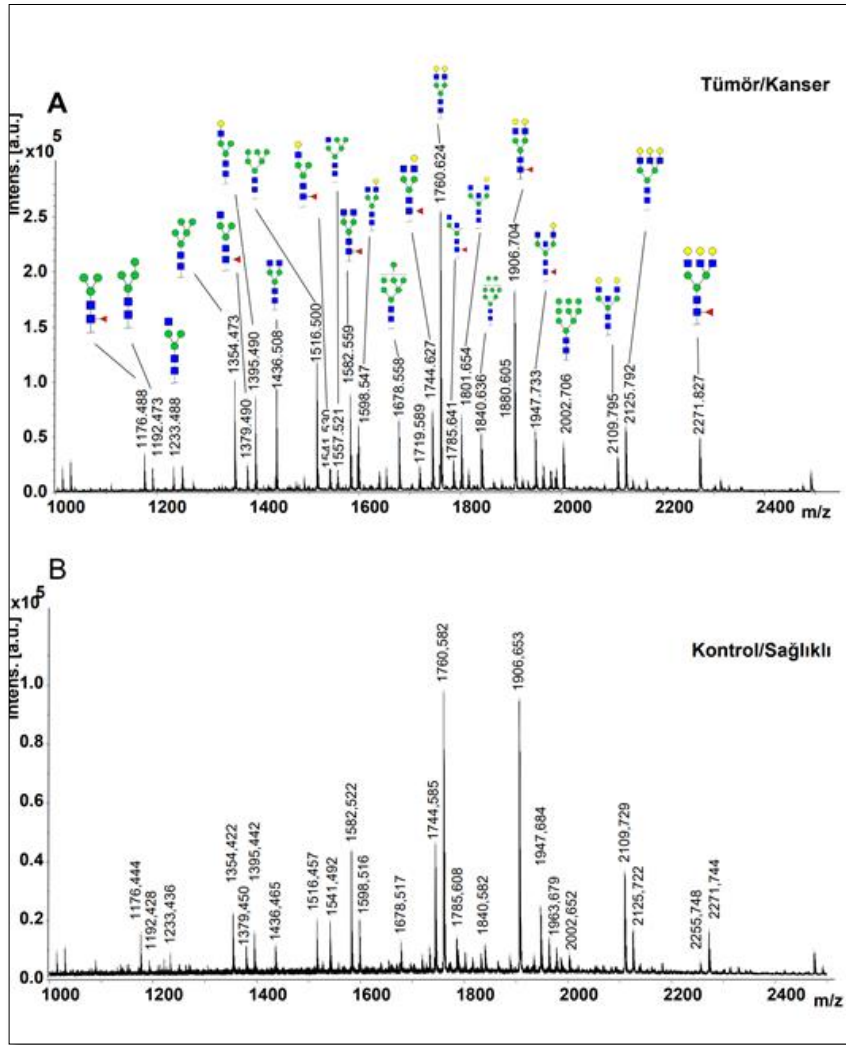
kullanılıp kullanılmadığını doğrulamak için de ROC (Receiver Operating Chareacteristics) analizleri yapıldı.

BÖLÜM 4

4.1. BÖBREK DOKULARINDAKİ *N*-GLİKANLARIN MALDI-MS VE MALDI-MS/MS ANALİZİ

İlk önce böbrek dokularından proteinler, yöntem kısmında açıklandığı gibi ekstrakte edildi, sonrasında glikoproteinlerden *N*-Glikanların salınımının sağlanması için PNGase-F enzimi kullanıldı. Son olarak da glikanlara 2-AA (nötr ve negatif iyonlaştırmada verimli) etiketleme işlemi uygulanıp saflaştırmaları yapıldı. Deneysel işlemler yapıldıktan sonra da MALDI-TOF-MS sistemi ile analizler gerçekleştirildi.

Şekilde 4.1’de böbrek kanser (tümör) dokusu ve kanserli dokunun komşu kontrol (sağlıklı) dokusuna ait bir *N*-Glikan profili görülmektedir. Çizelge 4.1’de de belirlenen *N*-Glikan kompozisyonlarına ait kütle bilgileri görülmektedir. Toplamda 33 adet *N*-glikan konformasyonu analizlerde tespit edilmiştir. *N*-glikanların göreceli bollukları nötr *N*-glikanlar üzerine yapılan çalışma ile belirlenmiştir. Toplamda 27 adet nötr *N*-glikan istatistiksel analizlerde değerlendirilmiştir. Sadece nötr *N*-Glikanların dikkate alınmasını sebebi ise; siyalik asitlerin galaktozlar ile arasındaki bağın lazer enerjisi altında zayıf olmasıdır. Ayrıca siyalik asitlerin daha kararlı hale geçmesi için ekstra indirgeme reaksiyonları gerçekleştirmek gerekmektedir.



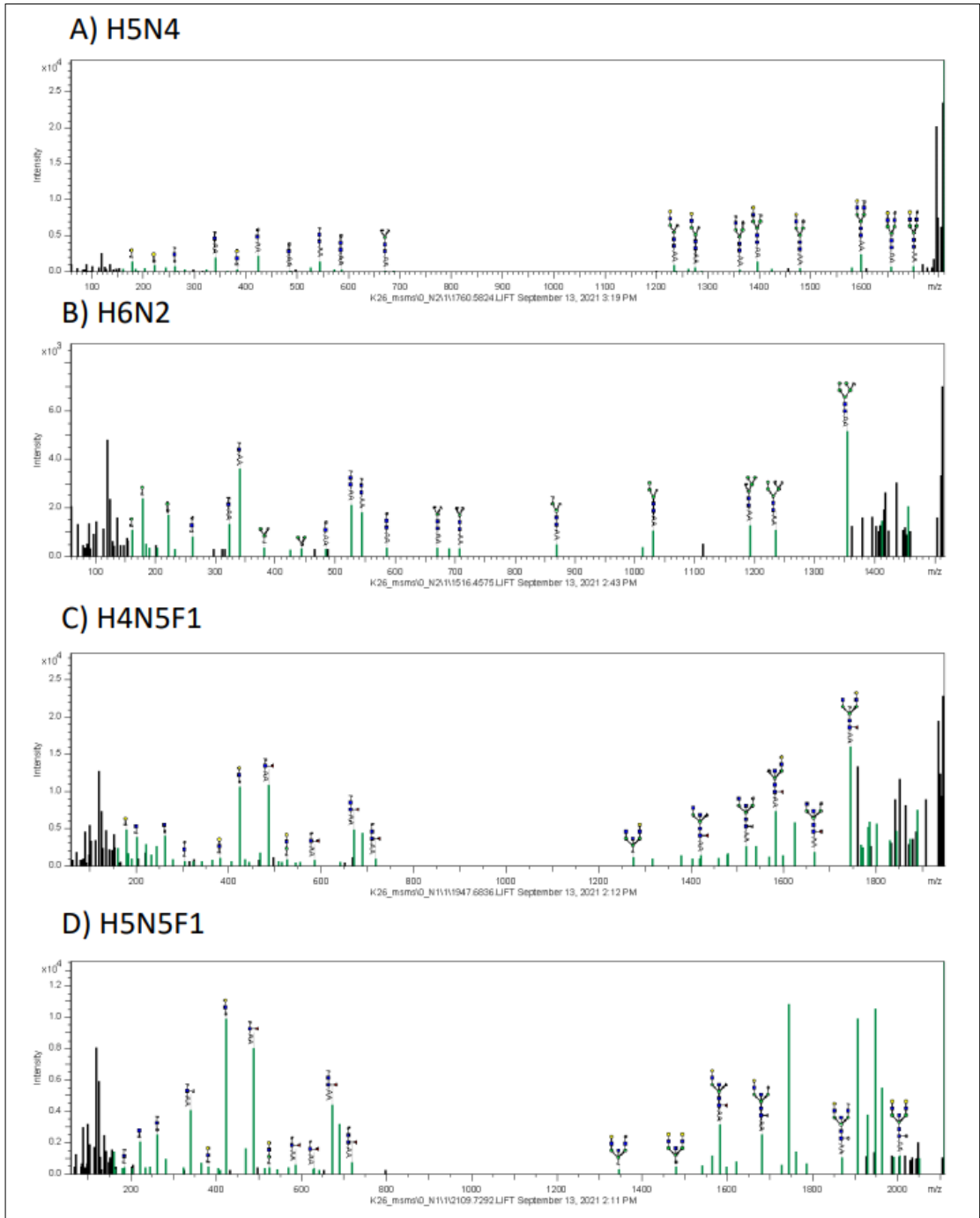
Şekil 4.1. MALDI-MS analizi; kanser ve sağlıklı doku için kütle spektrometresi.

Çizelge 4.1. MALDI-MS analizi; *N*-glikan kompozisyonları ve kütle spektrometrik bilgileri

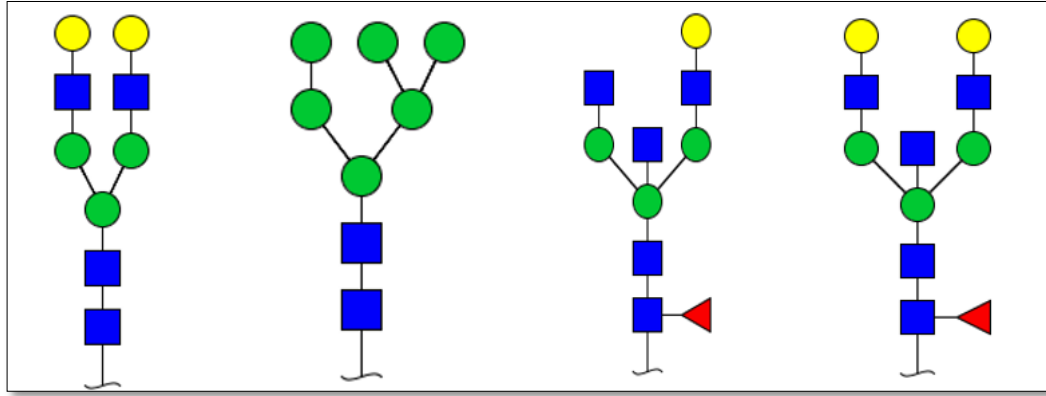
Sütun	Kompozisyon	Kütle / Yük	z	m/z calc.	Mr calc.	Δ MH+ [Da]	Δ m/z [ppm]	Skor	FragCov. [%]
1	Hex3HexNAc2dHex1-AA	1176,4881	-1	1176,4312	1177,4390	0,0569	48,37	36,9	18
2	Hex4HexNAc2-AA	1192,4745	-1	1192,4261	1193,4339	0,0484	40,63		
3	Hex3HexNAc3-AA	1233,4859	-1	1233,4526	1234,4605	0,0333	26,98		
4	Hex5HexNAc2-AA	1354,4728	-1	1354,4789	1355,4867	-0,0061	-4,52		
5	Hex3HexNAc3dHex1-AA	1379,4999	-1	1379,5105	1380,5184	-0,0107	-7,75	41,7	36
6	Hex4HexNAc3-AA	1395,4909	-1	1395,5055	1396,5133	-0,0146	-10,45		
7	Hex3HexNAc4-AA	1436,5115	-1	1436,5320	1437,5398	-0,0206	-14,31		
8	Hex6HexNAc2-AA	1516,5002	-1	1516,5317	1517,5396	-0,0316	-20,83	58,8	44
9	Hex4HexNAc3dHex1-AA	1541,5333	-1	1541,5634	1542,5712	-0,0301	-19,54	42,0	23
10	Hex5HexNAc3-AA	1557,5302	-1	1557,5583	1558,5661	-0,0281	-18,05		
11	Hex3HexNAc4dHex1-AA	1582,5621	-1	1582,5899	1583,5977	-0,0278	-17,56	33,2	12
12	Hex4HexNAc4-AA	1598,5563	-1	1598,5848	1599,5927	-0,0285	-17,85	48,6	38
13	Hex3HexNAc5-AA	1639,5836	-1	1639,6114	1640,6192	-0,0278	-16,94	25,2	17
14	Hex7HexNAc2-AA	1678,5563	-1	1678,5846	1679,5924	-0,0283	-16,85	41,0	33
15	Hex4HexNAc4dHex1-AA	1744,6257	-1	1744,6427	1745,6506	-0,0170	-9,75	53,1	35
16	Hex5HexNAc4-AA	1760,6238	-1	1760,6377	1761,6455	-0,0139	-7,90	65,6	48
17	Hex3HexNAc5dHex1-AA	1785,6500	-1	1785,6693	1786,6771	-0,0193	-10,83		

18	Hex4HexNAc5-AA	1801,6562	-1	1801,6642	1802,6720	-0,0080	-4,44	43,5	39
19	Hex4HexNAc3NeuAc1dHex1AA	1832,6591	-1	1832,6588	1833,6666	0,0003	0,18		
20	Hex8HexNAc2-AA	1840,6278	-1	1840,6374	1841,6452	-0,0095	-5,18		
21	Hex5HexNAc4dHex1-AA	1906,7040	-1	1906,6956	1907,7034	0,0085	4,44	61,8	51
22	Hex4HexNAc5dHex1-AA	1947,7379	-1	1947,7221	1948,7299	0,0157	8,08	51,7	42
23	Hex5HexNAc5-AA	1963,7344	-1	1963,7170	1964,7249	0,0174	8,84		
24	Hex9HexNAc2-AA	2002,7112	-1	2002,6902	2003,6980	0,0210	10,47		
25	Hex5HexNAc4dHex2-AA	2052,7716	-1	2052,7535	2053,7613	0,0181	8,83		
26	Hex5HexNAc5dHex1-AA	2109,7995	-1	2109,7749	2110,7828	0,0246	11,66	45,8	31
27	Hex6HexNAc5-AA	2125,7935	-1	2125,7699	2126,7777	0,0237	11,14	37,2	26
28	Hex10HexNAc2-AA	2165,7245	-1	2165,7517	2166,7595	-0,0272	-12,56		
29	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-AA	2197,8043	-1	2197,7910	2198,7988	0,0133	6,07		
30	Hex5HexNAc5dHex2-AA	2255,8304	-1	2255,8328	2256,8407	-0,0025	-1,10		
31	Hex6HexNAc5dHex1-AA	2271,8271	-1	2271,8278	2272,8356	-0,0007	-0,30	41,2	22
32	Hex5HexNAc4NeuAc2-AA	2342,7980	-1	2342,8285	2343,8363	-0,0305	-13,02		
33	Hex6HexNAc5dHex2-AA	2417,8051	-1	2417,8857	2418,8935	-0,0806	-33,34		

MALDI-MS gibi kütle spektrometrik çalışmalarda okunan değerlerin hangi moleküllere ait olduğu literature göre bilinebilmektedir. Glikanlara ait yeni bulunan kütlelerin kompozisyonlarının ve yapılarının doğrulanması için bazı ek çalışmalar yapılmalıdır. Bu çalışmalardan biri de MALDI MS/MS'dir. Bu bağlamda MALDI-MS analizinden sonra, *N*-Glikan yapılarını tam ve kesin olarak tanımlamak için MS/MS analizleri çalışma kapsamında yapıldı. Elde edilen tandem MS spektrumları Protein Scape yazılımına yüklendi ve Glycoquest algoritması kullanılarak parçalanma ürünleri ile eşleşen *N*-glikan yapıları tespit edildi. Çizelge 4.1'de yapı doğrulamaları sonucunda elde edilen skor ve parçalanma ürünleri de görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.2'de MALDI MS/MS (tandem MS) sonucunda *N*-Glikan kompozisyonlarının elde edilmiş parçalanma fragmentlerini içeren ve Protein Scape yazılımından elde edilen MALDI kütle spektrumları görülmektedir. Burada MS analizlerinde tespit edilen *N*-glikan konformasyonlarının yapısal doğrulamaları yapılmıştır. Bu sayede *N*-glikan gruplarının yapısal olarak sınıflandırılması yapısal bir çerçeveye oturtulmuştur. Spesifik parçalanma ürünleri takip edilerek yapısal bilgiler de elde edilmiştir. Örneğin glikanlarda fukoz bağlanma bölgesinin çekirdekten olduğu bu analizler sonucunda belirlenmiştir. Aynı zamanda bisektik *N*-glikanların yapıları da tandem MS analizleri ile doğrulanmıştır. Şekil 4.3'de de MALDI MS/MS sonucu yapı doğrulaması yapılan *N*-Glikanlardan bazıları gösterilmektedir. Çekirdekten fukozlanma burada da çok net görülmektedir.



Şekil 4.2. MALDI-MS/MS analizi; bazı *N*-glikanların parçalanma fragmentleri



Şekil 4.3. MALDI MS/MS sonucu ispat edilmiş bazı *N*-glikanlar , soldan sağa doğru A,B,C,D

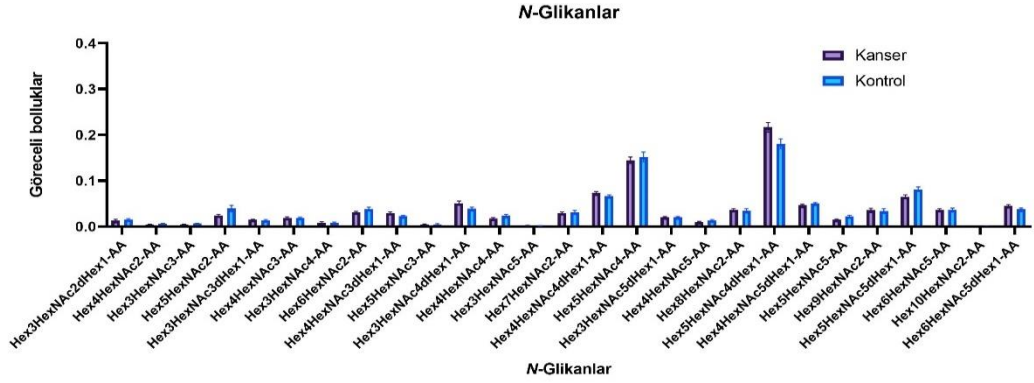
Analizler sonucunda elde edilen MS/MS spektrumları Protein Scape yazılımına aktarıldı ve yapı doğrulama analizleri için GlycoQuest algoritması kullanıldı. Bu analizler sonucunda 16 adet *N*-glikanın yapısı MS/MS düzeyinde aydınlatılmıştır. İstatiksel analizlerde nötr *N*-glikanların karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca *N*-glikanlar yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmıştır (fukozlanma, galaktozlanma vb.). Çalışmada toplamda 18 adet *N*-Glikan grubu belirlenmiş kanser-kontrol kıyaslamaları için bir nitelik olarak kullanılmıştır. Sonrasında tüm veriler üzerine kanser-kontrol kıyaslamaları istatistiksel yöntemler uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

4.2. *N*-GLİKANLARIN İSTATİSTİKSEL OLARAK KIYASLANMASI

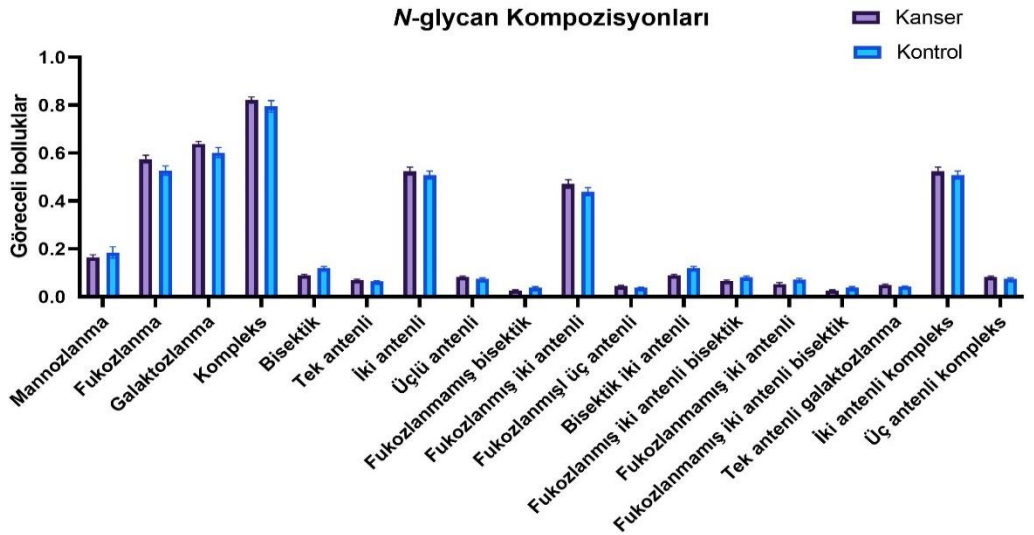
FlexAnalysis programı kullanılarak tespit edilen *N*-Glikan alanları ekstrakte edildi, tespit edilen *N*-Glikanların göreceli bollukları, toplam alan normalizasyon yaklaşımı kullanılarak hesaplandı. Daha sonra Graphpad Prizm yazılımına veriler aktrarıldı. Excel verileri, Graphpad Prizm yazılıma aktarıldıktan sonra glikanlara yönelik kanser (tümör) / kontrol (sağlıklı) kıyaslanmasının yapılabilmesi için, Klasik Çoklu T-testi ($p < 0.05$ anlamlı ve $p < 0.001$ çok anlamlı) ve Klasik Çoklu T-testinin parametrik olmayan testi olan Mann Whitney U testi uygulandı. Sonuç olarak fiziksel ve kimyasal olarak komşu dokular arasında *N*-Glikan yapıların farklılık olup olmadığı kontrol edildi.

4.2.1. Çoklu T-Testi (Parametrik Varsayım)

Veriler, parametrik sayılarak Klasik Çoklu T-testi yapıldı. Graphpad prism yazılımına göre şekil 4.4 ve şekil 4.5’de *N*-glikanların ve kompozisyonlarının göreceli bollukları grafike olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.4. *N*-glikan grafik; *N*-glikanların kanser ve kontrol dokudaki göreceli bollukları



Şekil 4.5. *N*-Glikan grafik; *N*-Glikan kompozisyonlarının kanser ve kontrol dokudaki göreceli bollukları

Kanser ve kontrol dokular arasında anlamlı farklılıklar olup olmadığını anlamak için Klasik Çoklu T-testi yapıldı. Her bir *N*-Glikan ve *N*-Glikan kompozisyonu için; ortalama değerler, standart sapma farklılıkları ve anlamlı bir fark olup olmadığını görmek için *p* değerleri (Holm) incelendi. Sonuç olarak, *N*-Glikan

kompozisyonlarından bisektik ve 2 antenli bisektik tiplerinde, kanserli ve kontrol dokular için anlamlı farklılık gözlemlendi. Yani bisektik *N*-glikan ve 2 antenli bisektik *N*-Glikan kompozisyonları, komşu kontrol (sağlıklı) dokularda, kanserli dokulara göre daha yoğun görülmektedir. Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3’de, *N*-glikanlara ve kompozisyonlarına ait Klasik Çoklu T-testi sonucu görülmektedir.

Çizelge 4.2. *N*-Glikan Klasik Çoklu T-testi sonuçları

	Anlamlı	Ortalama Fark	P Value (Holm)
Hex3HexNAc2dHex1-AA	Hayır	-0,002392	0,999753
Hex4HexNAc2-AA	Hayır	-0,001588	0,98984
Hex3HexNAc3-AA	Hayır	-0,002255	0,836919
Hex5HexNAc2-AA	Hayır	-0,01525	0,548408
Hex3HexNAc3dHex1-AA	Hayır	0,0007059	0,999987
Hex4HexNAc3-AA	Hayır	0,0001569	0,999987
Hex3HexNAc4-AA	Hayır	-0,0001373	0,999987
Hex6HexNAc2-AA	Hayır	-0,007451	0,864716
Hex4HexNAc3dHex1-AA	Hayır	0,007	0,361873
Hex5HexNAc3-AA	Hayır	-0,0006275	0,999987
Hex3HexNAc4dHex1-AA	Hayır	0,01218	0,652149
Hex4HexNAc4-AA	Hayır	-0,006647	0,872068
Hex3HexNAc5-AA	Hayır	0,0003922	0,999987
Hex7HexNAc2-AA	Hayır	-0,001294	0,999987
Hex4HexNAc4dHex1-AA	Hayır	0,006608	0,964628
Hex5HexNAc4-AA	Hayır	-0,007294	0,999875
Hex3HexNAc5dHex1-AA	Hayır	-7,84E-05	0,999987
Hex4HexNAc5-AA	Hayır	-0,004255	0,835177
Hex8HexNAc2-AA	Hayır	0,00151	0,999987
Hex5HexNAc4dHex1-AA	Hayır	0,03547	0,393334
Hex4HexNAc5dHex1-AA	Hayır	-0,003529	0,992637
Hex5HexNAc5-AA	Hayır	-0,007	0,548408
Hex9HexNAc2-AA	Hayır	0,001922	0,999987
Hex5HexNAc5dHex1-AA	Hayır	-0,01633	0,361873
Hex6HexNAc5-AA	Hayır	-0,0004902	0,999987
Hex10HexNAc2-AA	Hayır	-0,0003333	0,991838
Hex6HexNAc5dHex1-AA	Hayır	0,007667	0,665253

Çizelge 4. 3. *N*-Glikan Kompozisyonu Klasik Çoklu T-testi sonuçları.

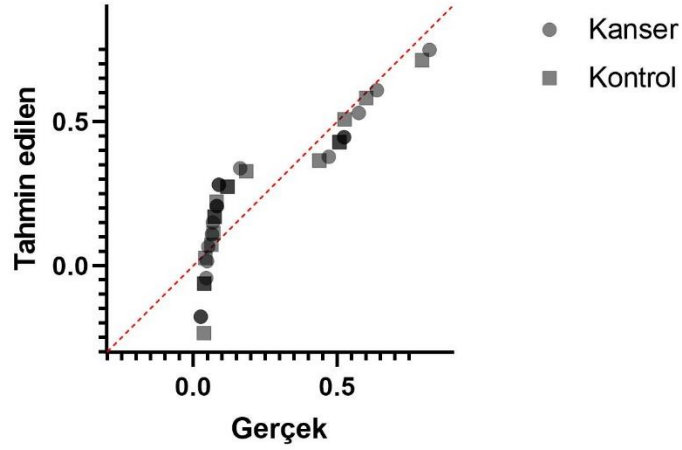
<i>N</i> -Glikan Kompozisyonu	Anlamlı	Ortalama Fark	P Value (Holm)
-------------------------------	---------	---------------	----------------

Mannozlanma	Hayır	-0,021	0,873
Fukozlanma	Hayır	0,049	0,496
Galaktozlanma	Hayır	0,037	0,663
Kompleks	Hayır	0,026	0,873
Bisektik	Evet	-0,03	0,004
Tek anten	Hayır	0,005	0,873
İki anten	Hayır	0,016	0,873
Üç anten	Hayır	0,008	0,814
Fukozlanmamış bisektik	Hayır	-0,012	0,274
Fukozlanmış iki anten	Hayır	0,032	0,814
Fukozlanmış üç anten	Hayır	0,008	0,492
Bisektik iki anten	Evet	-0,03	0,004
Bisektik fukozlu iki anten	Hayır	-0,016	0,234
Fukozlanmamış iki anten	Hayır	-0,017	0,634
Fukozlanmamış iki anten bisektik	Hayır	-0,012	0,274
Galaktozlanmış tek anten	Hayır	0,007	0,797
İki antenli kompleks	Hayır	0,016	0,873
Üç antenli kompleks	Hayır	0,008	0,814

4.2.2. Mann Whitney U Testi (Parametrik Olmayan)

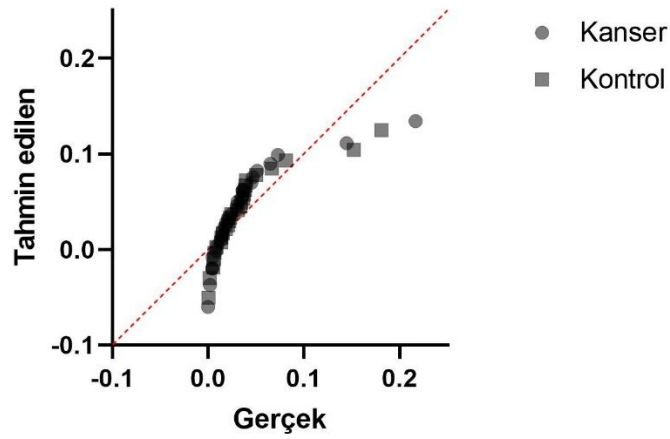
Graphpad Prism uygulamasında (çeşitli örneklem sayılarına göre yöntem belirlense de); Anderson-Darling, D'Agostino Pearson, Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testlerinin hepsi uygulanmış ve bütün testlere göre de verilerin normal dağılmadığı anlaşılmış ve Klasik Çoklu T testinin parametrik olmayan eşleniği olan Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Şekil 4.6 ve 4.7'da normallik durumu grafike edilmiştir.

Normal QQ plot *N*-Glikan Kompozisyon



Şekil 4.6. *N*-Glikan kompozisyonları normallik grafiği

Normal QQ plot *N*-Glikan



Şekil 4.7. *N*-Glikan normallik grafiği

Sonuç olarak Klasik Çoklu T-testi ile benzer ve güçlü olarak; bisektik ve iki antenli bisektik *N*-Glikan kompozisyonlarında, kanser ve kontrol dokular arasında anlamlı farklar görüldü. Yani bisektik *N*-glikan ve 2 antenli bisektik *N*-Glikan kompozisyonları, komşu kontrol (sağlıklı) dokularda, kanserli dokulara göre daha yoğun görülmektedir. Çizelge 4.4 ve 4.5' de *N*-Glikan ve kompozisyonlarının Mann Whitney U testi sonuçları görülmektedir.

Çizelge 4.4. N-Glikan Mann testi sonuçları

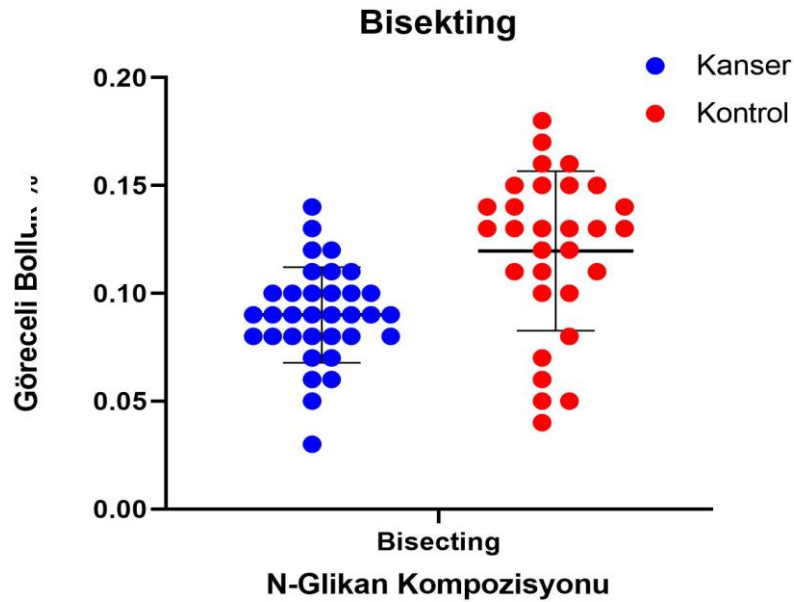
	Anlamlı	Ortalama Rank Farkı	P Değeri (Holm)
Hex3HexNAc2dHex1-AA	Hayır	-7,812	0,675778
Hex4HexNAc2-AA	Hayır	-3,89	0,996649
Hex3HexNAc3-AA	Hayır	-7,529	0,718237
Hex5HexNAc2-AA	Hayır	-8,094	0,730663
Hex3HexNAc3dHex1-AA	Hayır	1,067	0,99915
Hex4HexNAc3-AA	Hayır	-0,5647	0,99915
Hex3HexNAc4-AA	Hayır	-4,957	0,982582
Hex6HexNAc2-AA	Hayır	-4,706	0,986676
Hex4HexNAc3dHex1-AA	Hayır	9,255	0,563729
Hex5HexNAc3-AA	Hayır	-2,322	0,997323
Hex3HexNAc4dHex1-AA	Hayır	9,067	0,675778
Hex4HexNAc4-AA	Hayır	-8,722	0,680636
Hex3HexNAc5-AA	Hayır	1,255	0,99915
Hex7HexNAc2-AA	Hayır	3,482	0,997323
Hex4HexNAc4dHex1-AA	Hayır	6,431	0,943779
Hex5HexNAc4-AA	Hayır	-3,231	0,997323
Hex3HexNAc5dHex1-AA	Hayır	0,3765	0,99915
Hex4HexNAc5-AA	Hayır	-11,17	0,234884
Hex8HexNAc2-AA	Hayır	5,051	0,982582
Hex5HexNAc4dHex1-AA	Hayır	8,753	0,692778
Hex4HexNAc5dHex1-AA	Hayır	-5,427	0,980171
Hex5HexNAc5-AA	Hayır	-8,722	0,675778
Hex9HexNAc2-AA	Hayır	2,635	0,997323
Hex5HexNAc5dHex1-AA	Hayır	-12,3	0,182465
Hex6HexNAc5-AA	Hayır	0,9725	0,99915
Hex10HexNAc2-AA	Hayır	-1,067	0,997323
Hex6HexNAc5dHex1-AA	Hayır	9,098	0,675778

Çizelge 4.5. N-Glikan kompozisyon Mann testi sonuçları

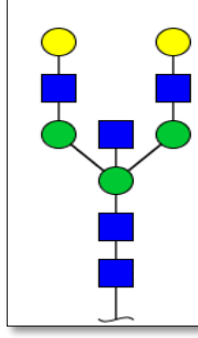
	Anlamlı	Ortalama Rank Farkı	P Değeri (Holm)
Mannozlanma	Hayır	1,945	0,969033
Fukozlanma	Hayır	7,498	0,717604
Galaktozlanma	Hayır	2,604	0,969033
Kompleks	Hayır	0	>0,999999
Bisektik	Evet	-17,22	0,002456
Tek anten	Hayır	1,757	0,969033
İki anten	Hayır	4,675	0,968732

Üç anten	Hayır	4,173	0,968732
Fukozlanmamış bisektik	Hayır	-10,07	0,346634
Fukozlanmış iki anten	Hayır	6,055	0,88717
Fukozlanmış üç anten	Hayır	9,098	0,430595
Bisektik iki anten	Evet	-17,22	0,002456
Bisektik fukozlu iki anten	Hayır	-12,3	0,112533
Fukozlanmamış iki anten	Hayır	-9,631	0,390077
Fukozlanmamış iki anten bisektik	Hayır	-10,07	0,346634
Galaktozlanmış tek anten	Hayır	3,137	0,968732
İki antenli kompleks	Hayır	4,675	0,968732
Üç antenli kompleks	Hayır	4,173	0,968732

Klasik Çoklu T-testi ve Mann Whitney U testi sonucu $p < 001$ seviyesi için anlamlı fark bulunan bisektik *N*-Glikan kompozisyonu için, göreceli bolluk oranı şekil 4.8’de görülmektedir. Ayrıca bisektik *N*-Glikan kompozisyonunun da gösterimi şekil 4.9’da gösterilmektedir.



Şekil 4.8. Bisektik *N*-Glikan; kanser ve sağlıklı doku için bisektik *N*-Glikan kompozisyonuna ait göreceli bolluk grafiği.



Şekil 4.9. Bisektik *N*-Glikan.

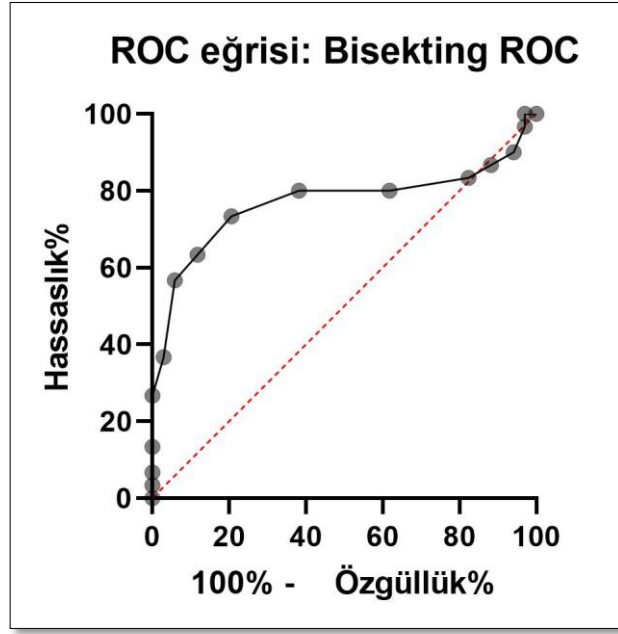
4.2.1.1. *N*-Glikan Gruplarının Yanıt Tahmin Yetenekleri (ROC Analizi)

Biyotanımlama ve biyobelirteç çalışmalarında, kanserli ya da sağlıklı olduğu bilinen örneklerle karşı biyobelirteçlerin ayırım kabiliyetini değerlendirmek için ROC (Receiver Operating Characteristic, alıcı işletim karakteristiği) analizi kullanılmaktadır. Bu analiz, böbrek kanser ve kontrol dokularındaki anlamlı farklılık gösteren *N*-Glikan kompozisyonlarında uygulandı. Çizelge 4.6'da; güven aralığı, hassaslık ve özgünlük oranına bağlı alan (doğruluk payı), standart hata verileri bulunmaktadır. ROC'a göre ayırım, yaklaşık %77 oldu ve *N*-Glikanların biyobelirteç olarak kullanılabilmesi bu sonuç kullanılarak görülebilmektedir. Yani güçlü ayırım yapan biyobelirteçler olarak görülmektedir.

Çizelge 4.6. Bisektik kompozisyonların ROC yorumlaması

ROC eğrisi altındaki alan	
Alan	0,7691
Standart hata	0,06659
95% güven aralığı	0,6386 to 0,8996
P değeri	0,0002

Şekil 4.10'de de ROC testine ait grafik görülmektedir. Bu grafiğe göre de ROC eğrileri, optimum kesme noktalarının üzerindedir ve sınır değerlere yakındır. Yani anlamlı değişiklik geçerlidir.



Şekil 4.10. ROC testi; bisektik kompozisyonların ROC Grafiği

Böbrek kanserinde, kontrol ve sağlıklı dokuların ayırt edilmesinde *N*-glikanların biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmamasına dair insan ve hayvan dokular üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar yapılırken; MALDI, sıvı kromatografisi, ELISA gibi temel ve destekleyici yöntemler kullanılmıştır. Literatürde renal hücre karsinom üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde genellikle serum ve plazma örnekleri üzerine odaklanılmıştır. Bunun yanında kanserli dokular üzerine yapılmış tek çalışma bulunmaktadır.

MALDI kütle spektrometresi kullanılarak yapılan bir çalışmada kanserli ve sağlıklı böbrek kanseri doku türünde de yüksek mannozlanma görülmüştür. Kontrol dokularında; bisektik *N*-asetilglukozamin (GlcNAc) ve çoklu fukoz içeren, bi, tri ve tetra antenli dallanma içeren glikanlar baskınlık gösterirken, kanserli dokularda ise Hex7HexNAc6Fuc1 Hex7HexNAc6Fuc1NeuAc1 glikanları fukozlanmış ve siyalil uzantılı *N*-Glikan yapıları belirgin olarak görülmüştür [71]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar burada elde edilen sonuçlar ile örtüşmektedir. Bir diğer çalışmada ise böbrek kanseri nedeniyle nefrektomi (böbrek alınması) ameliyat öncesi ve sonrası insan plazması üzerine LC-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilen bir analizde; iki antenli disiyalilli ve digalaktosil içeren yapılar azalırken, fukozlu iki antenli digalaktosilli ve

disiyalilli ve 3 antenli 3 galaktozilli ve siyalilli glikan yapıları ameliyat sonrası plazma örneklerinde artmıştır [72]. Serum örnekleri kullanılarak MALDI ile yapılan başka bir çalışmada böbrek kanserli hastalarda Hex5HexNAc6NeuAc1 ve Hex6HexNAc4NeuAc2Fuc1 glikanları yüksek oranda bulunmuştur [74]. Sıvı kromatografisi kullanılarak yapılan başka bir araştırmada; çekirdekten fukozlanmış iki antenli digalaktozlu ve disiyalilli yapılar plazma clusterin proteini özelinde yüksek oranda bulunmuştur [75].

ELISA benzeri testlerle yapılan başka bir çalışmada ise; kanserli dokularda GlcNAc'ın 1,2,3,6 karbonlarına bağlı fukozlu yapılarda artış gözlemlenmiştir. Genel olarak bakıldığında kanserli dokularda, yüksek seviyede siyalik asit ve fukoz görülmüştür [73].

Siyalik asit içeren *N*-glikanların (negatif yüklü *N*-Glikan içeren) MALDI lazer enerjisi altında kararlı olmamasından dolayı sadece nötr *N*-Glikanların göreceli bolluklarının istatistiksel analizlerde kullanılması, tezin çalışma limitasyonları olarak kabul edilebilir. Bu tarz kısıtlılıkların giderilmesi için alternatif yöntemler mevcut olmasına rağmen (etil-esterifikasyon, permetilasyon) bu yöntemlerin uygulanabilmesi için nispeten yüksek miktarda doku örneğine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmada sınırlı miktarda doku örneği ile yüksek duyarlılığa sahip bir etiketleme yöntemi kullanılmıştır.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezinde, renal hücreli karsinom ve yakın komşu kontrol dokuları arasındaki farkların glikan düzeyinde tespiti incelenmiştir. Deneyler ve analizler sonucunda da, nötr glikan düzeyinde bisektik glikan kombinasyonlarında anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir. ROC analizi sonucu da, %77 çıkmıştır ve renal hücreli karsinom ve komşu kontrol dokularındaki farklılıkları belirlemede, nötr bisektik *N*-glikanların biyobelirteç olarak kullanılmasında güçlü kanıtlar ortaya koyulmuştur. Literatürde önceki yapılan böbrek kanseri üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen verilerle bu tez kapsamında elde edilen verilerin örtüştüğü belirlenmiştir. Bu durum bisektik *N*-glikanların renal hücreli karsinomda yüksek doğrulukta biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bize göstermiştir.

Bir ileriki çalışma olarak; MALDI görüntüleme tekniği ile doku yüzeyinde *N*-glikanların kanser ve kontrol dokularındaki dağılım oranları belirlenmesi hedeflenmektedir. Böylece bu çalışmanın benzer bir yöntemle validasyonu yapılabilir. Ayrıca, makine öğrenmesi tekniği kullanılarak kanser/kontrol dokular arasındaki farklar da otomatize hale getirilebilir. Bu çalışmada ispatlanan bisektik *N*-glikanların neden kanserli dokularda azaldığını anlayabilmek için enzimatik çalışmalar da yapılabilir.

KAYNAKLAR

1. Tang, L., Chen, X., Zhang, X., Guo, Y., Su, J., Zhang, J., Peng, C., and Chen, X., "N-Glycosylation in progression of skin cancer", *Medical Oncology*, 36 (6): 50 (2019).
2. Banerjee DK., "N-glycans in cell survival and death: cross- talk between glycosyltransferases", *Biochem Biophys Acta.*, 1820 (9): 1338–46. (2012).
3. Varki, A., "Biological roles of glycans", *Glycobiology*, 27 (1): 3–49 (2017).
4. Uslupehlivan, M., "Transkripsiyon faktörü ttfib'nin glikozilasyon profilinin biyoinformatik ve deneysel olarak belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bilim Dalı*, İzmir, 10-20(2017).
5. Kayili, H. M., "Glikopeptitlerin kütle spektrometrik analizleri için yeni bir biyoanalitik yöntem geliştirilmesi ve insan c1-inhibitör proteininin ayrıntılı bölgeye özgü glikozilasyon analizinin gerçekleştirilmesi", Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Ankara, 6-28(2016).
6. Alçay, N., "Sağlık ve Hastalıkta Glikoproteinlerin Rolü", Tezsiz Yüksek Lisans, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı*, Ankara, 1-12(2006).
7. İnternet: National Center of Biotechnology, "Essentials of Glycobiology 3. edition", <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/> (2017)
8. Zabczyńska, M., Kozłowska, K., and Pocheć, E., "Glycosylation in the thyroid gland: Vital aspects of glycoprotein function in thyrocyte physiology and thyroid disorders", *International Journal Of Molecular Sciences*, 19 (9): 2792 (2018).
9. Helenius A1, A. M., "Intracellular functions of N-linked glycans", *Science Mag*, 291 (5512): 2364–9. (2001).
10. Ohtsubo, K. and Marth, J. D., "Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease", *Cell*, 126 (5): 855–867 (2006).
11. Holst, S., Wuhrer, M., and Rombouts, Y., "Glycosylation Characteristics of Colorectal Cancer", *Advances in Cancer Research 1st Ed.*, *Elsevier Inc.*, San Diego, 203–256 (2015).
12. Miyoshi, E., Moriwaki, K., and Nakagawa, T., "Biological function of

- fucosylation in cancer biology", *Journal Of Biochemistry*, 143 (6): 725–729 (2008).
13. Kanev, M. O. and Bakar, E., "Kanserde Glikokonjugatlar", *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2 (1): 1–5 (2016).
 14. Lity, A., Hoja-, D., Poche, E., Krem-, M., Cio, D., and Laidler, P., "Protein Glycosylation as Marker of Melanoma Progression", *Current Cancer Therapy Reviews*, 4 (2): 144–148 (2008).
 15. Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., and Kimura, N., "Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis", *Cancer Science*, 95 (5): 377–384 (2004).
 16. Veillon, L., Fakih, C., Abou-El-Hassan, H., Kobeissy, F., and Mechref, Y., "Glycosylation Changes in Brain Cancer", *ACS Chemical Neuroscience*, 9 (1) 51–72 (2018).
 17. Pinho, S. S. and Reis, C. A., "Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications", *Nature Reviews Cancer*, 15 (9): 540–555 (2015).
 18. Oliveira-Ferrer, L., Legler, K., and Milde-Langosch, K., "Role of protein glycosylation in cancer metastasis", *Seminars In Cancer Biology*, 44 (Jun): 141–152 (2017).
 19. Hakomori, S. I. and Cummings, R. D., "Glycosylation effects on cancer development", *Glycoconjugate Journal*, 29 (8-9): 565–6 (2012).
 20. Balog, C. I. A., Stavenhagen, K., Fung, W. L. J., Koeleman, C. A., McDonnell, L. A., Verhoeven, A., Mesker, W. E., Tollenaar, R. A. E. M., Deelder, A. M., and Wührer, M., "N-glycosylation of colorectal cancer tissues: A liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation", *Molecular And Cellular Proteomics*, 11 (9): 571–585 (2012).
 21. Arnold, J. N., Saldova, R., Abd Hamid, U. M., and Rudd, P. M., "Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation", *Proteomics*, 8 (16): 3284–3293 (2008).
 22. Stowell, S. R., Ju, T., and Cummings, R. D., "Protein Glycosylation in Cancer", *Annual Review Of Pathology: Mechanisms Of Disease*, 10 (1): 473–510 (2015).
 23. Dass, C., "Fundamentals of Contemporary Typography Mass Spectrometry, 1st ed.", Dominic M., D., Nico, M., *Wiley*, Hoboken, 5–50 (2007).
 24. Demirel Özlem, "Development Of Proteolytic Enzyme Immobilized Sol-Gel Target Surfaces For Digestion Based Proteomic Studies In Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry", Yüksel Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Ankara,

30-42(2009).

25. Chen, C. T., Yu, J. W., and Ho, Y. P., "Identification of bacteria in juice/lettuce using magnetic nanoparticles and selected reaction monitoring mass spectrometry", *Journal Of Food And Drug Analysis*, 27 (2): 575–584 (2019).
26. Ferranti, P., "Mass spectrometric approach for the analysis of food proteins", *European Journal Of Mass Spectrometry*, 10 (3): 349–358 (2004).
27. Hoffmann, E. de and Stroobant, V., "Mass Spectrometry 3rd Ed.", *Wiley*, Chichester, 5-189 (2007).
28. Taşkın Vedat, "Kütle Spektrometresi Verilerinin Analiziyle Prostat Ve Yumurtalık Kanserlerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği Ana Bilim Dalı*, İstanbul, 5-8 (2013).
29. De Hoffmann, E., "Mass spectrometry", Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology 5th Ed., Kirk-Othmer, *Wiley*, (2005).
30. Jürgen H Gross, "Mass Spectrometry: A Textbook, 3rd Ed.", *Springer Nature*, Cham, 67-463 (2004).
31. Ekman, R., Silberring, J., Brinkmalm, A., Kraj, A., "Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications, 1st Ed.", *Wiley*, Hoboken, 27-35 (2008).
32. Anas El-Aneed, A. C. & J. B., "Erratum: Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI and commonly used mass analyzers (Applied Spectroscopy Reviews)", *Applied Spectroscopy Reviews*, 44 (3): 210–230 (2009).
33. Ng, T. T., So, P. K., Hu, B., and Yao, Z. P., "Rapid detection and quantitation of drugs-of-abuse by wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry", *Journal Of Food And Drug Analysis*, 27 (2): 428–438 (2019).
34. Cole, R. B., "Electrospray and MALDI Mass Spectrometry Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, 1st Ed.", *Wiley*, Hoboken, 7-245 (2010).
35. Çelikbıçak Ömür, "Development Of Versatile And Reusable Target Surfaces For Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry", Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Ankara, 20-40 (2011).
36. Van Belkum, A., Welker, M., Pincus, D., Charrier, J. P., and Girard, V., "Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: What are the current issues?", *Annals Of Laboratory Medicine*, 37 (6): 475–483 (2017).

37. Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., and Teng, S. H., "Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology", *Journal Of Food And Drug Analysis*, 27 (2): 404–414 (2019).
38. Zenobi, R. and Knochenmuss, R., "ChemInform Abstract: Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry", *Mass Spectrometry Reviews*, 17: 337–366 (1998).
39. Xiaojun Feng, Xin Liu, Qingming Luo, and B.-F. L., "Mass Spectrometry In Systems Biology: An Overview", *Mass Spectrometry Reviews*, 27 (6): 635–660 (2008).
40. Wollnik, H., "Time-of-flight mass analyzers", *Mass Spectrometry Reviews*, 12: 89–114 (1993).
41. Braun, J. E. and Neusser, H. J., "Threshold photoionization in time-of-flight mass spectrometry", *Mass Spectrometry Reviews*, 21 (1): 16–36 (2002).
42. Francese, S., Dani, F., Traldi, P., Mastrobuoni, G., Pieraccini, G., and Moneti, G., "MALDI Mass Spectrometry Imaging, from its Origins up to Today: The State of the Art", *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 12 (2): 156–174 (2009).
43. Longuespée, R., Casadonte, R., Kriegsmann, M., Pottier, C., Picard de Muller, G., Delvenne, P., Kriegsmann, J., and De Pauw, E., "MALDI mass spectrometry imaging: A cutting-edge tool for fundamental and clinical histopathology", *Proteomics - Clinical Applications*, 10 (7): 701–719 (2016).
44. Grassl, J., Taylor, N. L., and Millar, A. H., "Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging", *Plant Methods*, 7 (1): Makale Numarası:21 (2011).
45. Holst, S., Heijs, B., De Haan, N., Van Zeijl, R. J. M., Briaire-De Bruijn, I. H., Van Pelt, G. W., Mehta, A. S., Angel, P. M., Mesker, W. E., Tollenaar, R. A., Drake, R. R., Bovée, J. V. M. G., McDonnell, L. A., and Wuhrer, M., "Linkage-Specific in Situ Sialic Acid Derivatization for N-Glycan Mass Spectrometry Imaging of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues", *Analytical Chemistry*, 88 (11): 5904–5913 (2016).
46. Zaima, N., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., and Setou, M., "Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry", *International Journal Of Molecular Sciences*, 11 (12): 5040–5055 (2010).
47. Magni, F., Lalowski, M., Mainini, V., Marchetti-Deschmann, M., Chinello, C., Urbani, A., and Baumann, M., "Proteomics imaging and the kidney", *Journal Of Nephrology*, 26 (3): 430–436 (2013).
48. Heijs, B., Holst, S., Briaire-De Bruijn, I. H., Van Pelt, G. W., De Ru, A. H., Van

- Veelen, P. A., Drake, R. R., Mehta, A. S., Mesker, W. E., Tollenaar, R. A., Bovée, J. V. M. G., Wuhrer, M., and McDonnell, L. A., "Multimodal Mass Spectrometry Imaging of N-Glycans and Proteins from the Same Tissue Section", *Analytical Chemistry*, 88 (15): 7745–7753 (2016).
49. Chatterji, B. and Pich, A., "MALDI imaging mass spectrometry and analysis of endogenous peptides", *Expert Review Of Proteomics*, 10 (4): 381–388 (2013).
 50. Powers, T. W., Holst, S., Wuhrer, M., Mehta, A. S., and Drake, R. R., "Two-dimensional N-glycan distribution mapping of hepatocellular carcinoma tissues by MALDI-imaging mass spectrometry", *Biomolecules*, 5 (4): 2554–2572 (2015).
 51. Alexandrov, T., "MALDI imaging mass spectrometry: statistical data analysis and current computational challenges.", *BMC Bioinformatics*, 13 Suppl 16 (Suppl 16): S11 (2012).
 52. Ruhaak, L. R., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A. M., and Wuhrer, M., "Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification", *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 397 (8): 3457–3481 (2010).
 53. Yamada, K. and Kakehi, K., "Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use", *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 55 (4): 702–727 (2011).
 54. Griffiths, J., R., Unwin, R., D., "Analysis of Protein Post-Translational Modifications by Mass Spectrometry, 1st Ed.", Dominic M., D., Nico, M., *Wiley*, Hoboken, 98–107 (2016).
 55. Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J., "MALDI MS A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications", 2nd Ed., *Wiley*, Weinheim, 248–253 (2014).
 56. Pabst, M. and Altmann, F., "Glycan analysis by modern instrumental methods", *Proteomics*, 11 (4): 631–643 (2011).
 57. Lauber, M. A., Yu, Y. Q., Brousmiche, D. W., Hua, Z., Koza, S. M., Magnelli, P., Guthrie, E., Taron, C. H., and Fountain, K. J., "Rapid preparation of released N-glycans for HILIC analysis using a labeling reagent that facilitates sensitive fluorescence and ESI-MS detection", *Analytical Chemistry*, 87 (10): 5401–5409 (2015).
 58. Chen, Y., Zhang, Y., and Yang, P., "Glycosite Analysis in Glycoproteomics by Mass Spectrometry", *Current Proteomics*, 7 (3): 158–167 (2010).
 59. Mechref, Y., "Analysis Of Glycans Derived From Glycoconjugates By Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry", *Electrophoresis*, 32 (24): 3467–3481 (2011).

60. Szabo, Z., Guttman, A., Rejtar, T., and Karger, B. L., "Improved sample preparation method for glycan analysis of glycoproteins by CE-LIF and CE-MS", *Electrophoresis*, 31 (8): 1389–1395 (2010).
61. Budnik, B. A., Lee, R. S., and Steen, J. A. J., "Global methods for protein glycosylation analysis by mass spectrometry", *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins And Proteomics*, 1764 (12): 1870–1880 (2006).
62. Coskun, Ö, "Seperation techniques: Chromatography", *North Clin İstanbul*, 3(2):156-60(2016)
63. Ettre, L.S., "Chromatography: the seperation Technique of the 20th Century", *Chromatographia*, 51(1):7-17 (2000)
64. Buszewski, B., Noga, S., "Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) - Powerful Seperation Technique", *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 402(1):231-247(2012)
65. Bayraktar, E., "Mesane Ve Böbrek Kanserlerinde Bikunin Geninin Ifade Düzeyinin Araştırılması Ve Mutasyonel Taraması", Yüksek Lisans Tezi, *Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Gaziantep, 8-11(2013)
66. Enterili, G., "Böbrek Tümörlerinde Nitrik Oksit, Arilesteraz Ve Paraoksanaz Enzim Aktivitelerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Gaziantep, 6-8(2015)
67. Koçak Ö.F, Kayılı H.M, Albayrak M, Yaman M.E, Kadioğlu Y, Salih B, "N-glycan profiling of papillary thyroid carcinoma tissues by MALDI-TOF-MS", *Analytical Biochemistry*, 584:113389 (2019)
68. Yaman E.M, Kayılı H.M, Albayrak M, Kadioğlu Y, Salih B, "Differential N-Glycosylation Profiling Of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Invasive Ductal Carcinoma Tissues Using MALDI-TOF-MS", *Molecular Omics*, 3:349-474 (2021)
69. Koçak, Ö.F, "Tiroid Kanserinin Bazi Glikanlar Ve Bazi Eser Elementler İle İlişkisinin Spektroskopik Yöntemler Kullanılarak Belirlenmesi", Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum, 27-74 (2019)
70. Yaman M.E, "İnvaziv Duktal Karsinom Tanısı Almış Meme Dokusu Örneklerine Ait N-Bağlı Glikozilasyon Yapılarının Glikomiks Yaklaşımı İle Analizi Ve Biyobelirteç Potansiyellerinin Araştırılması", Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum, 31-69 (2018)
71. DRAKE R.R., MCDOWELL C., WEST C., DAVID F., " Defining The Human

Kidney N-Glycome In Normal And Cancer Tissues Using MALDI Imaging Mass Spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry*, 55(4):e4490(2020)

72. TOUSI F., BONES J., ILIOPOULOS O., HANCOCK W.S., HINCAPIE M., "Multidimensional Liquid Chromatography Platform For Profiling Alterations Of Clusterin N-Glycosylation In The Plasma Of Patients With Renal Cell Carcinoma", *Journal of Chromatography*, 1256:121-128 (2012)
73. KLUCZYK-BORZYM M., RADZIEJEWSKA I., DAREWICZ B., "Glycosylation Of Proteins In Healthy And Pathological Human Renal Tissues", *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 50(4):599-604(2012)
74. HATAKEYAMA S., AMANO M., TABISAWA Y., YONEYAMA T., TSUCHIYA N., HABUCHI T., NISHIMURA S., OHYAMA C., "Serum N-Glycan Alteration Associated with Renal Cell Carcinoma Detected by High Throughput Glycan Analysis", *The Journal of Urology*, 191(3): 805-813(2014)
75. GBORMITTAH F.O., BONES J., HINCAPIE M., TOUSI F., HANCOCK W., ILIOPOULOS O., "Clusterin Glycopeptide Variant Characterization Reveals Significant Site-Specific Glycan Changes in the Plasma of Clear Cell Renal Cell Carcinoma", *Journal of Proteome*, 14(6):2425-2436(2015)

EK AÇIKLAMALAR A.

ETİK KURUL İZİNİ



**T.C.
KARABÜK ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**

4/12/2019

Karar No: 2019/117

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet KAYILI

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz "Renal Hücre Karsinomunun MALDI-Görüntüleme Kütle Spektrometresi İle Glikan Düzeyinde İncelenmesi" başlıklı araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Girişimsel Olmayan Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiştir. Etik açıdan bir sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiş ve uygun görülmüştür. Bilgilerinize rica ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Zafer LİMAN
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Ekler:

1-Kurul Üyeleri Değerlendirme Formları

Şekil Ek A.1. Etik Kurul İzni

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet ÇALIŞKAN Lise eğitimini Bucak Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra, Lisans eğitimi için Karabük Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Tıp Mühendisliği Bölümünü kazandı. 2018 yılında Onur öğrencisi olarak tamamladı. Yüksek Lisans eğitimini Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı'nda "Renal hücre karsinomunun glikan düzeyinde incelenmesi" adlı tezini tamamladı ve mezun oldu.