



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİKAN PROFİLLEME İLE MS OLİGOKLONAL BAND
ANALİZİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

FURKAN ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Dr. Hasan Ümit Öztürk

İSTANBUL-2024



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİKAN PROFİLLEME İLE MS OLİGOKLONAL BAND
ANALİZİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

FURKAN ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Dr. Hasan Ümit Öztürk

İSTANBUL-2024

Anabilim Dalı:

Biyokimya ve Moleküler Biyoloji

Program:

Biyokimya ve Moleküler Biyoloji

Tez Başlığı:

**Glikan Profilleme ile MS Oligoklonal
Band Analizinin Gerçekleştirilmesi**

Öğrencinin Adı-Soyadı:

Furkan Şahin

Savunma Sınavı Tarihi:

/ /

Bu tez çalışması jürimiz tarafından. Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Jüri Başkanı)

Unvanı, Adı-Soyadı

İmza

Kurumu

Üye (Tez Danışmanı)

Unvanı, Adı-Soyadı

İmza

Kurumu

Üye

Unvanı, Adı-Soyadı

İmza

Kurumu

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

15.05.2024

Furkan Şahin

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca laboratuvar altyapısını bana sunan, derin bilgi ve perspektifiyle tezime her aşamada desteğini esirgemeyen sevgili danışmanım Prof.Dr. Ahmet Tarık Baykal’a

Lisans ve lisansüstü eğitimimin büyük çoğunluğunda beraber çalıştığım, bana bilgisi ve güveniyle desteğini hiç esirgemeyen sevgili danışmanım Dr. Hasan Ümit Öztürk’e

Tezimle ilgili her aşamada bana destek olan, çalışmamda sıkışıklığa düştüğüm her anda bana yeni bir yön gösteren, gösterdiği desteğin karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim sevgili Dr. Zehra Zehra Kaya’ya

Tezimde ve özel hayatımda her dara düştüğümde yanımda olan, destekleri, dostlukları ve enerjileri olmasa bu tezi asla tamamlayamayacağım, benim için her zaman özel bir yere sahip olacak en yakın dostlarım Kübra Bilgiç, Özge Aksoy, Sibel Zeybek ve Esra Yılmaz’a

Lisans ve lisansüstü eğitimim süresince tanışma ve birlikte çalışma şansına eriştiğim başta Sümeyye Onat, Sude Nur Arslan ve Şeyma Işık olmak üzere tüm TÜBİTAK MAM İTAL ailesine

Hayatımın her anında yanımda olan bana her zaman destek olan sevgili annem Azime Şahin, babam Bayram Şahin ve kız kardeşim Büşra Şahin’e ve en zorlu günlerimde benim için bir ışık olan, her zaman beni cesaretlendiren ve umutlandıran hayat arkadaşım Buse Alaca’ya en derin sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum

Bu araştırma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TYL-2023-137 numaralı proje ile desteklenmiştir. Acıbadem Üniversitesine projeye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Multipl Skleroz	5
2.1.1 Epidemiyoloji	5
2.1.2 Etiyoloji	6
2.1.3 Hastalığın moleküler mekanizması.....	9
2.1.4 Tanı yöntemleri.....	10
2.2 Bağışıklık Sistemi	12
2.2.1 Doğuştan gelen bağışıklık	12
2.2.2 Sonradan edinilen bağışıklık	13
2.3 Glikozilasyon.....	17
2.3.1 N-Glikozilasyon.....	19
2.3.2 Glikomiks analizler	21
3 GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1 Gereçler	28
3.2 Yöntemler.....	30
3.2.1 Etik kurul izni ve örneklerin sınıflandırılması	30
3.2.2 İmmunoglobulin G zenginleştirme	31
3.2.3 Serum ve BOS'tan elde edilen immunoglobulinlerin deglikozilasyonu	31
3.2.4 N-Glikanların etil esterifikasyon ile türevlendirilmesi	31
3.2.5 Etil esterifiye edilmiş N-Glikanların zenginleştirilmesi	32
3.2.6 MALDI-TOF MS analizi	32
3.2.7 İstatistiksel veri analizi.....	33
4 BULGULAR	34
4.1 N-Glikanların MALDI-TOF Analiz Sonuçları.....	34

4.2	İstatistik Analiz Sonuçları	39
4.2.1	Tüm band tiplerinin tek yönlü varyans analizi	39
4.2.2	Hastalık durumuna göre birleştirilmiş örneklerle yapılan analizler	52
5	TARTIŞMA	62
5.1	N-Glikanların MALDI-TOF Analiz Sonuçları	62
5.2	İstatistik Analiz Sonuçları	64
5.2.1	Tüm band tiplerinin tek yönlü varyans analizi	64
5.2.2	Hastalık durumuna göre birleştirilmiş örneklerle yapılan analizler	65
6	SONUÇ	69
7	KAYNAKLAR	70
8	EKLER	79
Ek 1 A:	Glikanlara ait Shapiro-Wilk sonuçları	79
Ek 1 B:	Glikanlara ait Levene testi sonuçları	80
Ek 1 C:	Glikanlara ait One-Way ANOVA sonuçları	81
Ek 1 D:	Glikan gruplarına ait Shapiro Wilk testi sonuçları	82
Ek 1 E:	Glikan gruplarına ait Levene testi sonuçları	82
Ek 1 F:	Glikan gruplarına ait One-Way ANOVA sonuçları	82
Ek 1.G:	Çalışmada tespit edilen bazı N-Glikanlar ve özellikleri	83
Ek 1.H:	N-glikan grupları ve grupların hesaplanması	85
Ek 2.	Etik Kurul Onay Formu	88
9	ÖZGEÇMİŞ	90

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ACN	Asetonitril
ADCC	Antikora bağı hücresel sitotoksiste
ADCP	Antikora bağı hücresel fagositoz
Asn297	Asparajin 297
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CD	Yüzey farklılaşma antijenleri
CDR	Tamamlayıcılık belirleme bölgesi
ddH₂O	Ultra saf su
DNA	Deoksiribonükleik asit
EBV	Epstein-Barr virüsü
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
ER	Endoplazmik retikulum
Fab	Bağlanma bölgesi
Fc	Kristalizasyon bölgesi
Fuc	Fukoz
Gal	Galaktoz
GalNac	N-asetil galaktozamin
GlcNac	N-asetil glukozamin
HLA	İnsan Lökosit Antijen
HOBt	Hydroxybenzotriazole
IEF	İzoelektrik fokuslama
Ig	İmmunoglobulin
IgA	İmmunoglobulin A
IgD	İmmunoglobulin D
IgE	İmmunoglobulin E

IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IL	İnterlökin
KBB	Kan beyin bariyeri
MALDI	Matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/ionlaştırma
Man	Mannoz
MBP	Miyelin temel protein
MHC	Büyük doku uygunluk kompleksi
MOG	Miyelin oligodendrosit glikoprotein
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MS	Kütle spektrometrisi
MS	Multipl Skleroz
MSS	Merkezi sinir sistemi
N-Glikan	Azot grubuna bağlanan glikan
Neu5Ac	Siyalik asit
O-Glikan	Oksijen grubuna bağlanan glikan
OKB	Oligoklonal bant analizi
PCA	Temel bileşen analizi
PNGase F	Peptid endo- β -N-asetilglukozaminodaz F enzimi
RNA	Ribonükleik asit
S-DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit ve 2-hidroksi-5-metoksibenzoik asit
TFA	Trifloroasetik asit
TOF	Uçuş zamanı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Multipl Skleroz görülme sıklığını gösteren harita (36).....	6
Şekil 2. Multipl Skleroz hastalığının moleküler mekanizması	10
Şekil 3. Multipl skleroz hastası ve sağlıklı insana ait MRI çizimi.....	11
Şekil 4. Oligoklonal band analiz görüntüleri	12
Şekil 5. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından tanınan paternler ve paternleri tanıyan reseptörler.....	13
Şekil 6. T ve B hücrelerinin patojenlere karşı yanıt oluşturma süreçleri	14
Şekil 7. İmmünglobulinlerin fonksiyonel özellikleri	15
Şekil 8. IgG yapısı ve IgG alt sınıfları	16
Şekil 9. VDJ rekombinasyonu ile antikor üretimi.....	17
Şekil 10. Glikozillenmiş moleküller, glikan sınıfları ve glikoprotein karakterizasyon yaklaşımları (113)	18
Şekil 11. Glikozilasyon sınıfları.....	19
Şekil 12. Glikozilenmiş bir antikor yapısı.....	20
Şekil 13. Farklı metotlarla yapılan glikan analizlerinin iş akışları (113).....	21
Şekil 14. Tez çalışmasında kullanılan spin kolonlar	23
Şekil 15. Antikor saflaştırma sürecine ait iş akışı	23
Şekil 16. PNGase F enzim reaksiyonunun şematik gösterimi	24
Şekil 17. Tez çalışmasında kullanılan, pamuk ve pipet ucu ile oluşturulan glikan zenginleştirme kolon sistemi.....	25
Şekil 18. En sık kullanılan floresan işaretleyici moleküller (113).....	26
Şekil 19. MALDI-TOF sisteminin çalışma prensibi	27
Şekil 20. Etil esterifikasyon reaksiyonu	27
Şekil 21. Tez çalışmasının şematik gösterimi	30
Şekil 22. Farklı PNGase F miktarlarıyla yapılan deneyler.....	34
Şekil 23. Oligoklonal bant sonuçlarına göre sınıflandırılmış serum örneklerinin MALDI-TOF MS spektrumları.....	35
Şekil 24. Beyin omurilik sıvısından izole edilen immünoglobulinler ile yapılan MALDI-TOF MS analiz sonuç örnekleri.....	36
Şekil 25. Seçilmiş bir örneğin etil esterifiye edildikten sonra -20 C'de 0, 7 ve 14.gün yapılmış analizleri	37
Şekil 26. OKB tiplerine göre IgG indekslerini gösteren kutu grafiği	39
Şekil 27. OKB tiplerine göre beyin omurilik sıvısı IgG miktarlarını gösteren kutu grafiği.....	40

Şekil 28. OKB tiplerine göre serum IgG miktarlarını gösteren kutu grafiği.....	41
Şekil 29. OKB tiplerine göre serum Albumin miktarlarını gösteren kutu grafiği.....	41
Şekil 30. OKB tiplerine göre beyin omurilik sıvısı Albumin miktarlarını gösteren kutu grafiği	42
Şekil 31. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı farklılık gösteren H3N5F1 isimli glikana ait kutu grafiği.....	43
Şekil 32. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı farklılık gösteren H5N4F1 isimli glikana ait kutu grafiği.....	43
Şekil 33. Anlamlı sonuç gösteren glikanların, hastaların yaşlarıyla olan ilişkisini analiz eden korelasyon testine ait ısı haritası	44
Şekil 34. H3N5F1 ve H5N4F1 isimli glikanların yaş ile ilişkisini gösteren nokta grafiği.....	44
Şekil 35. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren GG14 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği.	45
Şekil 36. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren GG16 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği	45
Şekil 37. Tek yönlü varyans nalizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren GG18 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği	46
Şekil 38. Anlamlı sonuç veren glikan gruplarının, hastaların yaşlarıyla olan ilişkisini analiz eden korelasyon testine ait ısı haritası	46
Şekil 39. Tüm glikan gruplarının yaş ile ilişkisini gösteren nokta grafiği	47
Şekil 40. Tüm OKB gruplarında anlamlı farklılık gösteren glikanlar ile yapılan PCA analizi ve küme grafiği.....	48
Şekil 41. Tüm OKB gruplarında anlamlı farklılık gösteren glikan grupları ile yapılan PCA analizi ve küme grafiği	48
Şekil 42. Tüm glikanların birbiriyle korelasyon ilişkisini gösteren “Spearman” korelasyon analizi ısı haritası	49
Şekil 43. Glikanlar ve hastalara ait serum IgG miktarı, BOS IgG miktarı, IgG indeksi verileriyle yapılmış “Spearman” korelasyon analizine ait ısı haritası	50
Şekil 44. Glikan grupları ve hastalara ait serum IgG miktarı, BOS IgG miktarı, IgG indeksi verileriyle yapılmış “Spearman” korelasyon analizine ait ısı haritası	51
Şekil 45. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren H3N4F1 isimli glikana ait kutu grafiği	53
Şekil 46. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren H3N5F1 isimli glikana ait kutu grafiği	54
Şekil 47. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren H5N4F1 isimli glikana ait kutu grafiği	54
Şekil 48. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren GG8 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği.....	55

Şekil 49. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren GG14 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği.....	55
Şekil 50. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren GG16 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği.....	56
Şekil 51. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren GG18 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği.....	56
Şekil 52. ROC analizinde kullanılan parametre ayarları.....	58
Şekil 53. ROC analizi için örneklerin normalizasyon öncesi ve sonrası görüntüler.....	58
Şekil 54. Hasta-Sağlıklı örneklerle ait anlamlı sonuç gösteren glikanlarla yapılmış ROC analiz sonuçları	59
Şekil 55. Hasta-Sağlıklı örneklerle ait anlamlı sonuç gösteren glikan gruplarıyla yapılmış ROC analiz sonuçları.....	60
Şekil 56. Diğer hastalık-Sağlıklı örneklerle ait anlamlı sonuç gösteren glikan gruplarıyla yapılmış ROC analiz sonuçları	61

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan sarf ve kimyasallar	28
Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve firmaları	29
Tablo 3. Çalışmada kullanılan örneklere ait bilgiler	33
Tablo 4. Glikan grupları ve tanımlamaları	38
Tablo 5. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren glikanlara ait değerler	42
Tablo 6. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren glikan gruplarına ait bilgiler	42
Tablo 7. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş anlamlı sonuç veren glikanlara ait ortalama değerleri ve ANOVA p değerlerini gösteren tablo.....	52
Tablo 8. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş anlamlı sonuç veren glikan gruplarına ait ortalama değerleri ve ANOVA p değerlerini gösteren tablo	53
Tablo 9. AUC değerlerinin yorumlanması	57

ÖZET

Glikan Profillemeye ile MS Oligoklonal Band Analizinin Gerçekleştirilmesi

Multipl Skleroz otoimmün bir nörodejeneratif hastalıktır. 20-40 yaş arasında semptomlarının başlaması sebebiyle gençler arasında en yaygın görülen nörodejeneratif hastalık olarak sınıflandırılır. Hastalık vücudun kendi savunma hücreleri tarafından sinir hücrelerinin etrafını saran lipid tabakayı oluşturan miyelin kılıfa saldırarak sinir hücrelerinin hasara uğramasıyla oluşur. Hastalığa tanı koyabilmek için en sık kullanılan yöntem Oligoklonal Band Analizidir. Bu analiz ise hastalık şüphesi oluşan kişilerden alınan serum ve beyin omurilik sıvıları kullanılarak gerçekleştirilir. OKB sonuçlarına göre immunoglobulinlerin görülme durumlarına bağlı olarak MS tanısı konulur. İmmunoglobulinler serumda bulunan immün glikoproteinlerdir. B hücreleri tarafından üretilen bu Y şekilli glikoproteinler düşman patojenleri yokederler. İmmüoglobulinler B hücrelerinde sentezlendikten sonra posttranslasyonel bir modifikasyon olan glikozillenmeye uğrarlar. Bu immünoglobulinlerin 297.Asparajin aminoasidinin (Asn297) azot (N) atomuna bağlanan glikanlar proteinin fonksiyonlarını düzenler. Bu modifikasyon çeşitli kromatografik ve kütle spektroskopisine dayalı yöntemlerle analiz edilebilirler. Bu analizler sonucunda da hasta ve sağlıklılar arasındaki glikan motiflerinin farkları ve yoğunlukları belirlenerek hastalıklara karşı belirteçler ve hastalıkların moleküler mekanizmalarını aydınlatacak bilgiler elde edilebilir. MALDI-TOF tekniği de sık kullanılan bir kütle spektroskopisi yöntemidir. Bu tez çalışmasında OKB sonuçlarına göre 5 tipe ayrılmış hasta örneklerinden IgG'ler izole edilmiş, izole edilen IgG'lerden PNGase F ile glikanlar koparılmış, koparılan glikanlar etil esterifiye edilerek türevlendirilmiş, türevlendirilmiş bu glikanlar pamuk kolon kullanılarak izole edilmiş ve MALDI-TOF kütle spektroskopisiyle analiz edilmiştir. Analiz sonucu OKB tiplerine göre istatistiki anlamlı glikanlar ve glikan grupları belirlenmiştir

Anahtar Sözcükler: Multipl skleroz, İmmünoglobulin G, N-Glikan, MALDI-TOF, Glikomiks

ABSTRACT

Performing MS Oligoclonal Band Analysis by Glycan Profiling

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune neurodegenerative disease. It is the most common neurodegenerative disease among young people, with symptoms typically beginning between the ages of 20 and 40. The disease occurs when the body's own defence cells attack the myelin sheath, the lipid layer that surrounds the nerve cells, causing damage to the nerve cells. The most commonly used method to diagnose MS is oligoclonal band analysis (OCB). OCB is performed using serum and cerebrospinal fluids. The results of OCB are used to diagnose MS based on the patterns of immunoglobulins. Immunoglobulins are immune glycoproteins found in serum. These Y-shaped glycoproteins, produced by B cells, destroy hostile pathogens. After synthesis in B cells, immunoglobulins undergo glycosylation, a posttranslational modification. The attachment of glycans to the N (nitrogen) atom of the 297th asparagine amino acid of immunoglobulins regulates the solubility and function of the protein. This modification can be analysed by various chromatographic and mass spectroscopic methods. As a result of these analyses, the differences and intensities of glycan motifs between patients and healthy subjects can be determined, and information can be obtained to elucidate disease markers and molecular mechanisms of diseases. MALDI-TOF is also a frequently employed mass spectrometry technique. In this thesis, immunoglobulin G's were isolated from patient samples, which were divided into five categories according to OCB results. The glycans were cleaved from the isolated immunoglobulins with PNGase F, and the cleaved glycans were ethyl esterified. Derivatised glycans were isolated using a cotton column and analysed by MALDI-TOF mass spectrometry. The results of the analysis led to the identification of statistically significant glycans and glycan groups, which were correlated with the OCB types.

Keywords: Multiple sclerosis, Immunoglobulin G, N-Glycan, MALDI-TOF, Glycomics

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl Skleroz (MS) otoimmün ve nörodejeneratif hastalıktır. Belirtileri 18-40 yaş arasında görülmeye başlanır ve gençler arasında en sık görülen nörolojik hastalıktır (1). Mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamış olsa da temelde hastalık kişinin sinir hücrelerinin etrafını kaplayan ve sinirler arası iletişimde elektrik iletimini yalıtarak hızlı ve düzenli şekilde ilerlemesini sağlayan lipid bir tabaka olan miyelin kılıfın hasar görmesiyle oluşur. Sinir sisteminin hasar görmesi sebebiyle kişide motor beceriler, konuşma becerileri, duyma gibi işlevler zamanla kayba uğrar (2-4).

Hastalık Avrupa'da 100.000 kişide 100 prevalansında ve Türkiye'de 100.000 kişide 96 prevalansında görülür (5). Hastalık, normal durumlarda vücuda giren bakteri, virüs vb. patojenleri tanıyarak onları durduran bağışıklık sistemi hücrelerinin vücudun kendi hücrelerine saldırmasıyla oluşur (6,7). Sağlıklı insanlarda beyni vücudun geri kalanından ayıran Kan Beyin Bariyerini (KBB) aşamayan bağışıklık hücreleri MS'de bu bariyeri aşarak sinir hücrelerinin etrafını saran miyelin kılıfa ve bu kılıfla ilişkili olan Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein (MOG)'lar gibi yapılara saldırarak sinir sistemine zarar verir (8,9).

Hastalığın beyin ve sinir sistemiyle ilişkili olması sebebiyle fiziki belirtiler görülmeden tanı koyulabilmesi oldukça zordur. Hastalık belirtileri görülmeye başlandıktan sonra da birden fazla yöntemin bir arada kullanılmasıyla tanı kriterleri kullanılarak koyulmaktadır. Bu yöntemlerden başlıca kullanılanları beynin manyetik alan içerisinde görüntülenmesini sağlayan Manyetik Rezonans (MR), serum ve beyin omurilik sıvılarının bir jel içerisinde yürütülmesiyle gerçekleştirilen Oligoklonal Band Analizidir (10,11).

Oligoklonal Band Analizi (OKB) hastalık şüphesi olan kişiden alınan serumun ve Lomber ponksiyon ile alınan beyin omurilik sıvısının (BOS) izoelektrik fokuslama yöntemiyle (IEF) analiz edilmesine dayanır (11,12). Analiz sonucunda serumda ve BOS'da görülen immünoglobulin bantlarının durumlarına göre 5 farklı tipte sonuç bulunmaktadır. Bu tiplerden 2 tanesi MS ile ilişkilendirilerek tanı koyulur (13-15).

İmmunoglobulinler (Ig) ya da sıklıkla kullanılan isimleriyle antikorlar adaptif bağışıklık sisteminin önemli bir parçasını oluştururlar. B lenfosit hücreleri tarafından üretilen bu glikoproteinler hedeflendikleri reseptörlere bağlanarak hastalık etmenlerinin nötralize edilmesi, opsonize edilmeleri, proliferasyonu tetikleyici reseptörlere bağlanarak durdurulmaları, diğer bağışıklık hücrelerinin tanınması için işaretleyici olma gibi görevlere sahiptirler (16–19). Ağır zincir ve hafif zincir olarak adlandırılan iki farklı yapının birleşmesiyle oluşan bu immunoglobulinler B hücrelerinde sentezlendikten sonra posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayarak işlevsel özelliklerini kazanırlar.

Glikozilasyon en sık görülen posttranslasyonel modifikasyondur. Serumda dolaşan proteinlerin yaklaşık %80'i glikozilasyona uğrar (20). Proteinlerin belirli sekanslarına bağlanarak yapılarında ve işlevlerinde farklılık oluşturan bu glikanlar proteinlerin aksine belirli bir kalıp üzerinden inşa edilmezler (21). Hücre içerisindeki çeşitli durumlara bağlı olarak glikoziltransferaz enzimleri glikozilasyon sürecini kontrol eder. Bu kalıptan bağımsızlık glikozilasyonun yaşlanma, hastalıklar, beslenme gibi farklı durumlar karşısında değişim göstermesine ve sentezlenen glikan motiflerinin değişmesini sağlar. Bu değişimler ise çeşitli hastalıkların tanısı ve takibinde yardımcı olurlar (22–35).

Bu tezin temel amacı Multipl Skleroz hastalığının tanısında kullanılan Oligoklonal Band Analiz sonuçlarına göre kişilerden izole edilen antikorlardaki glikanların MALDI-TOF sistemi ile analiz edilerek OKB analiziyle uyumlu olarak glikanların ayırıcı bir tanı yöntemi olarak kullanılabilme durumlarını incelemek ve MS'in moleküler mekanizması hakkında bilgi edinmektir.

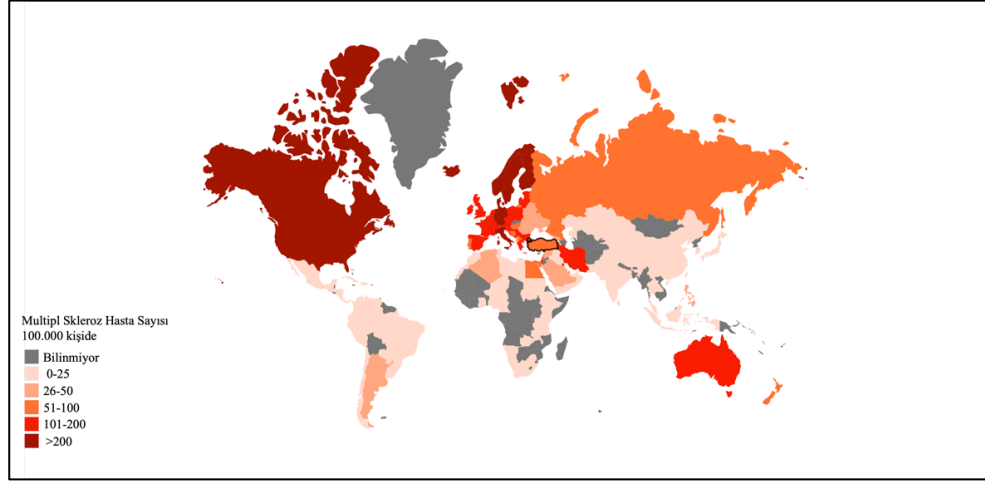
2 GENEL BİLGİLER

2.1 Multipl Skleroz

2.1.1 Epidemiyoloji

Multipl Skleroz hastalığının semptomları genellikle 20-40 yaşları arasında görülmeye başlanır. Dünya çapında hastalık 35,9/100.000 sıklıkta, Türkiye’de ise bu sayı 96,4/100.000 sıklık şeklinde görülmektedir. En sık görülme bölgesi ise 402/100.000 oranla Orkney adalarıdır. Dünya çapında yaklaşık olarak 4 milyon insanın hastalığa sahip olduğu düşünülmektedir (5,36) (Şekil 1).

Kadınlarda erkeklere oranla görülme riski 3 kat daha fazladır (37). 1930-1990’lı yıllar arasında kadınlarda MS’nin görülme oranının arttığı bilinmektedir. Bu artışın tarihsel olarak değişimini inceleyerek kadınlarda hastalığın artışının geçmiş dönemlerde kadınların hamilelik oranlarının daha fazla olması ve hamilelik hormonlarının MS’e karşı koruyucu etkileri olduğu hipotezini savunan çalışmalar yapılmıştır (37–39). Yakın zamanlı çalışmalarda, genetik analizlerin de katkısıyla birlikte bu farkın X kromozomuyla ilişkisinin de yüksek olabileceği tartışılmaktadır (37,39). Kadınlarda iki adet erkeklerde ise bir adet bulunan X kromozomu yaklaşık olarak 2000 gen içerir (40). Bu genlerden bazıları *FOXP3*, *TLR7* gibi bağışıklık sistemiyle ilişkili genlerdir (41). Kadınlarda iki adet bulunan bu kromozomun fazla gen ekspresyonu yaratmaması için X kromozomunun biri kadınlarda inaktive edilir. Fakat bu inaktivasyon tüm genlerde işe yaramaz (37,40–42). Genlerden yaklaşık %15’i inaktivasyondan kaçarak fazla eksprese edilirler (40,43). Bu inaktivasyondan kaçan immün sistemle ilişkili genler tarafından üretilen proteinlerin fazla ekspresyonunun MS’nin kadınlarda daha fazla görülmesine sebep olduğu düşünülmektedir (9,42,44).



Şekil 1. Multipl Skleroz görülme sıklığını gösteren harita (36)

2.1.2 Etiyoloji

Hastalığın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte tek bir nedene bağlı olarak gelişen bir hastalık olmadığı ve çoklu faktörlerin bir araya gelerek hastalığa sebep olduğu bilinmektedir (10,45). Sebepleri arasında genetik, çevresel faktörler, D vitamini eksikliği, stres, virüsler gibi farklı etkenler sayılabilir (9,10,44–48)

2.1.2.1 Genetik faktörler

Multipl Skleroz hastalarının %15'i ailelerinde MS hastalığı bildirmiştir (49,50). İkiz kardeş çalışmaları ve anket çalışmalarının sonuçlarıyla birlikte MS'in monozygotik ikiz kardeşlerde, her iki kardeşte de görülme oranının %25-40 arası olduğu bildirilmiştir (50–53). Bu bilgilerle birlikte hastalık klasik mendel genetiği yaklaşımıyla işleyen tek bir genin anne-babadan çocuğa aktarılmasıyla görülen monogenetik yapıda bir genetik hastalık değildir. Birden fazla genin sebep olduğu poligenik bir hastalıktır (49–51).

Yapılan genom çapında ilişkilendirme (genome wide association studies-GWAS) çalışmalarında hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülen çok sayıda gen belirlenmiştir. Bu genlerden bazıları *HLA-DRB*, *IL-7RA*, *IL-2RA*, *CXCR5*, *IRF8*, *TNF5F14*, *STAT3* gibi genlerdir (46,54,55). Bu genlerin tamamı immün sistem ile ilişkilendirilen genlerdir fakat hepsinin hastalık ile olan ilişkisi net olarak belirlenememiştir.

İçlerinden sadece *HLA-DRB* geninin hastalıkla olan ilişkisi kesin olarak tanımlanabilmiştir. HLA genleri (Human Leukocyte Antigen-İnsan Lökosit Antijen) insanlarda antijenlerin T hücrelerine sunulması ve immün yanıt oluşturmalarıyla ilişkili bir gen ailesidir. Bu genin *HLA-DRB14* aleli hastalığa karşı koruyucu etki ile ilişkilendirilirken *HLA-DRB15* aleli hastalıkla ilişkilendirilmektedir (1,3,9).

2.1.2.2 Çevresel faktörler

Multipl Sklerozla ilişkilendirilen birden fazla çevresel faktör bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi dünya çapında yüz milyonlarca insanın kullandığı ve farklı hastalıklarla ilişkilendirilen sigaradır (52,53). Yapılan çalışmalarda aktif ve pasif sigara içiciliğiyle birlikte hava kirliliğinin de MS riskini arttırdığı belirlenmiştir (53,54). Sigara kullanımının insan akciğerlerinde enflamasyonu tetiklediği, bu enflamasyon sürecinde akciğerde merkezi sinir sistemiyle (MSS) ilişkili antijenlere karşı hücreler bulunması durumunda bu hücreler MSS'e saldırmak üzere tetiklendiği düşünülmektedir (52–54). Aktif içiciliğin, MS hastalığını tetiklemesinin yanında hastalığa karşı tedavi amaçlı kullanılan monoklonal antikorlara karşı vücudun antikor geliştirmesini tetiklediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (55).

Hastalıkla ilişkilendirilen bir diğer çevresel faktör ise D Vitaminidir. Vitamin vücutta bir hormon gibi işlev görür (56–58). İnsanlar bu vitamini vücutlarında UV radyasyonunun 7-dehidrokolesterol hormonunun fotolizlemesiyle sentezleyebilirler. Bunun yanında çeşitli sebzelerden ve balık ürünlerinden bu vitamini elde edebilirler (57). Hücreye taşıyıcı proteinler tarafından alınan vitamin sitoplazmada Vitamin D Reseptörlerine (VDR) bağlanarak çekirdeğe ve geçer. Burada Retinoid X Reseptörleriyle (XDR) dimer oluşturur. Bu VDR/XDR dimeri D vitamin elementlerine bağlanarak 1000'den fazla genin transkripsiyonunu kontrol eder (56,59). Bu sayede farklı hücreler üzerinde etkili rol oynar (60). Bunlardan bazıları da immün hücreleridir. Makrofajlar, T hücreler ve B hücreleri gibi farklı hücrelerin regülasyonu ve immün yanıtında rol oynar (61,62). Örneğin makrofajlarda transkripte olan CYP27B1 geni D vitaminin sentez sürecinde aktif konuma gelmesini sağlayan enzimi kodlar. Bu sayede ortamdaki D vitamini lokal olarak enflamasyonun olduğu bölgede artış gösterir, D vitamini artışı da antibakteriyel etki gösteren Katelisidin ve

Defensin üretilmesini sağlar (60,63,64). Farklı bir şekilde ise D vitamini miktarının yüksekliği interlökin 2'yi (IL-2) azaltarak T hücrelerinin proliferasyonunu baskılar (64). B hücrelerinde ise D vitamini ko-stimülatör moleküllerin daha az üretilmelerine sebep olur (57,62–65) . Farklı şekillerde işlev görmesi immün regülasyonundaki önemini göstermektedir. Bu sebeple vitamin eksikliğinin regülasyonu bozduğu ve otoimmüniteye sebep olduğu düşünülmektedir (64).

Islam ve arkadaşları (66) tarafından yapılan ikiz çalışmasında MS'e sahip monozigotik kardeşin sağlıklı kardeşe göre daha az güneş ışığına maruz kaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte diyetlerinde destekleyici olarak ekstra D vitamini alan kadınlarda almayan kadınlara göre %40 daha az MS görüldüğü bildirilmiştir (63). Üzerinde uzlaşma sağlanamasa bile çeşitli çalışmalarda annelerin serumunda bulunan D vitamini dalgalanmalarının doğacak çocuklarda MS riskini arttırdığı hatta doğulan ayın bile hamilelik sürecinde güneş ışığına maruz kalınımına bağlı olarak MS ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (63,67). Willer ve arkadaşlarının çalışmasında (68) Kanada, İngiltere, Danimarka ve İsveç'te doğan kişiler arasında MS hastalığına sahip kişilerin en yüksek oranda Mayıs ayında doğdukları ve aynı şekilde en az MS hastasının Kasım ayında doğduğu görülmüştür. İran'da yapılan bir diğer çalışmada ise MS hastalarının en çok Mart-Nisan ayları arasında doğduğu görülmüştür (69).

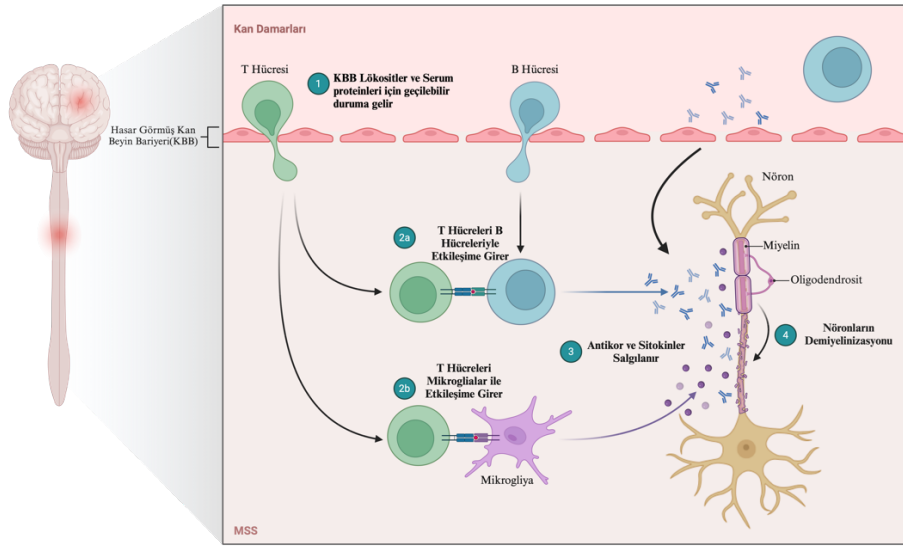
Bir diğer çevresel etken ise virüslerdir. Birden fazla virüsün hastalık ile ilişkili olabileceği düşünülse de Epstein-Barr Virüsünün hastalıkla kesin olarak ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Epstein-Barr Virüsü (EBV) bilinen 8 insan Herpesvirüsünden biridir ve tanımlanabilmiş ilk insan tümör virüsüdür (48). Genom büyüklüğü sayesinde 100 farklı proteini kodlayabilen büyük yapı bir virüstür (70). Yetişkin insanların %90'ının bu virüs tarafından enfekte edildiği düşünülmektedir. Virüs genellikle oral yolla bulaşmaktadır fakat anne sütü ve organ nakli gibi yollarla da geçebilmektedir (71,72). Vücuda girdikten sonra virüs B hücrelerinin zarlarını aşarak hücreyi enfekte eder ve latent fazda kendini kopyalatarak vücutta çoğalır. Kendini çoğaltma süreci boyunca kişide herhangi bir hastalık belirtisi görülmez. Bağışıklık sisteminin zayıf hale geldiği noktalarda çeşitli hastalık belirtileri oluşturarak kendini belli eder. Amerikan ordusunda 20 yıl boyunca yapılmış olan bir çalışmada EBV seropozitif olan kişilerde MS riskinin 32 kat arttığı belirlenmiştir (73).

İlişkili sebep tam olarak bilinmese de yapılmış çalışmalarla virüsün proteinlerinin vücudun oto antijenlerine benzerlik göstermesi ve immün sistemin yanıt vermesiyle ilişkilendirilmektedir (74,75).

2.1.3 Hastalığın moleküler mekanizması

Kan Beyin Bariyeri (KBB) endotel hücrelerin sıkı bağlar ve adheren bağlar ile birbirlerine tutunmalarıyla oluşmuştur. Kan Beyin Bariyeri, ismiyle ilişkili olarak beyin ve vücut arasında bir bariyer ve sınır kontrol noktası görevi görerek beyne girecek moleküllerin ve hücrelerin kontrolünü sağlar (76). Sağlıklı insanlarda bu bariyer yapısı bağışıklık hücreleri ve molekülleri tarafından aşılamaz fakat dokuyu oluşturan bağlar çeşitli sebeplerle hasar gördüğünde hücreler beyin bölgesine girebilirler. Multipl Skleroz hastalığında çeşitli sebeplerle vücudun kendi antijenlerine karşı hedeflenmiş lenfositler ve bağışıklık hücreleri bu bariyeri aşar ve hücrelere saldırırlar (76,77). Mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte CD4+T ve CD8+T hücreleriyle birlikte B hücrelerinin bu mekanizmada önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Temelde mekanizma CD4+ T hücrelerinin KBB'yi aşmak için matriks metalloproteinazlar salgıladıktan sonra sıkı bağları bozar ve beyne giriş yaparlar (47,78). T hücreleri giriş yaptıktan sonra çeşitli sitokinler salgılayarak CD8+ T hücreleri, doğal katil hücreleri, B hücreleri ve monositler gibi farklı bağışıklık hücrelerinin girişlerini tetikler ve hızlandırır (47,79,80). Beyne giren bu hücreler sinir hücreleri olan nöronların etraflarını saran lipid tabaka olan miyeline ve bu miyelin tabakanın tamiri ve oluşturulmasını sağlayan oligodendrositlere saldırarak miyelin tabakanın hasar görmesini ve tekrar oluşturmasını engellerler (81,82). Kesin olarak sadece MS'le ilişkilendirilmiş iki otoantijen bulunmaktadır. Bunlar Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein (MOG) ve Miyelin Temel Protein (MBP)'dir (47,79,80,82–84) (Şekil 2).

Bu immün saldırı içerisinde ana görevi T hücreleri görmektedir. Yakın zamanlı çalışmalar antikör üreten B hücrelerinin de hastalığın ana mekanizmasında işlevleri olduğunu düşündürse de mekanizma tam olarak bilinmemektedir (81,83,85,86). Hastalıkla ilişkisi tam anlaşılamamış olmakla birlikte B hücreleri tarafından üretilen antikörler hastalığın tanısının koymak için kullanılmaktadır (83,86,87).



Şekil 2. Multipl Skleroz hastalığının moleküler mekanizması

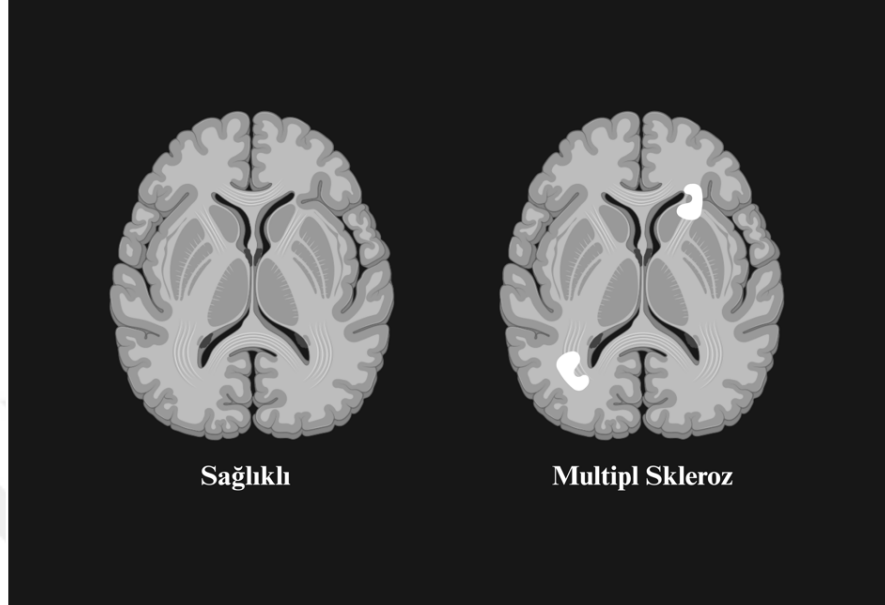
2.1.4 Tanı yöntemleri

Multipl Skleroz için kesin tanı koymaya yönelik bir belirteç bulunamadığı için hastalık tanısı, oluşturulan kriterlerle çeşitli hastalıkların dışlanmasıyla koyulmaktadır (88). Güncel olarak kullanılan kriterler McDonald ve arkadaşları tarafından oluşturulmuş ve en son 2017 yılında güncellenmiştir (89). Bu kriterlere bağlı olarak tanı klinik görüş, görüntüleme sonuçları ve laboratuvar test sonuçlarının birleştirilmesiyle koyulmaktadır (89).

Klinik görüş kişide görülen atakların sayısı ve süresine göre hekim tarafından verilir. Buna bağlı olarak Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve Oligoklonal Band Analizi (OKB) tetkikleri gerçekleştirilerek kesin tanı konulur (12,14,88–91).

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) beyin hastalıklarının birçoğunda tanı amaçlı kullanılmaktadır. Çalışma prensibi temelde dokudaki hidrojen atomlarının çekirdeklerinin, oluşturulan manyetik alanla uyarılarak elde edilen sinyallerin bilgisayar tarafından analiz edilmesine dayanır (92,93). Multipl skleroz hastalığında görülen demiyelinizasyon sonucu oluşan iltihaplanma beyin dokusunun iç kısmı olan beyaz cevherde MRG’de görülen beyaz renkli plakalar oluşturur ve bunların şekli,

konumları ve büyüklükleri gibi bilgiler değerlendirilerek tanıya destek olur (89,94,95) (Şekil 3).

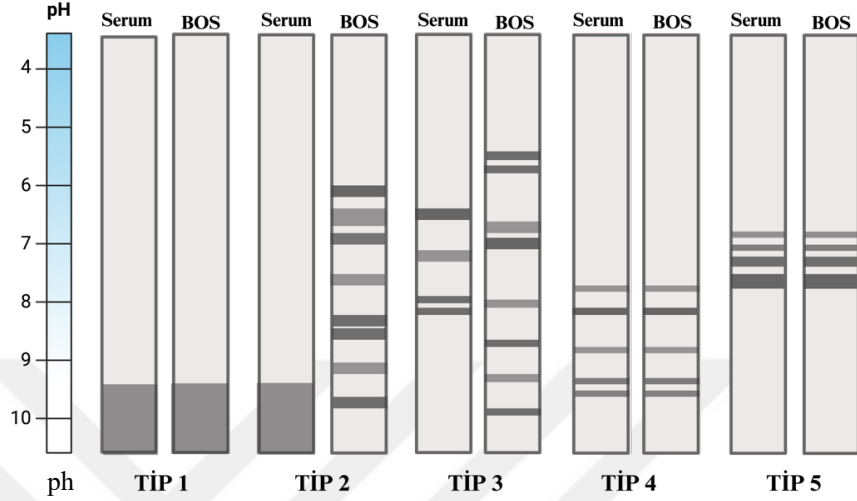


Şekil 3. Multipl skleroz hastası ve sağlıklı insana ait MRI çizimi

Oligoklonal Band Analizi (OKB) tanı için kullanılan en önemli yöntemdir. Band analizi hastalık şüphesi taşıyan kişilerden alınan serum ve beyin omurilik sıvılarının elektroforez sisteminde yürütülmeleriyle gerçekleşen İzoelektrik Fokuslama (IEF) yöntemiyle gerçekleştirilir (12,96). Proteinler yapılarında hem asidik hem de bazik aminoasitler taşırlar. Bu sebeple proteinler hem negatif hem pozitif yüklere sahip olarak ortamda bulunabilir ve hareket edebilirler. Bu yükün nötr konumda olduğu pH değeri izoelektrik nokta olarak isimlendirilir ve her protein kendine özgü bir değere sahiptir. İzoelektrik fokuslama yöntemi bu temel prensibi kullanır (85,97). Serum ve beyin omurilik sıvısı pH gradienti olan bir jelde yürütülür ve bu sayede immunoglobulinler spesifik izoelektrik noktalarında sabit kalırlar (97).

Bu yöntem sonucu 5 farklı tip tanımlanır. Oligoklonal band analizi de bu tiplere göre gerçekleştirilir (97). Tip 1’de kişinin serum ve BOS’unda herhangi bir band görülmez ve kişi MS değil olarak tanımlanır. Tip 2’de kişinin serumunda band görülmezken beyin omurilik sıvısında oligoklonal band görülür ve kişiye MS tanısı yapılabilir. Tip 3’te ise kişinin serumunda oligoklonal bandlar görülür fakat beyin

omurilik sıvısında band görülmez ve kişiye MS tanısı yapılabilir. Tip 4 ve 5'te serum ve BOS'ta ayna görüntüleri olarak tanımlanan bandlar görülür ve MS harici hastalıklarla ilişkilendirilir (97,98) (Şekil 4).



Şekil 4. Oligoklonal band analiz görüntüleri

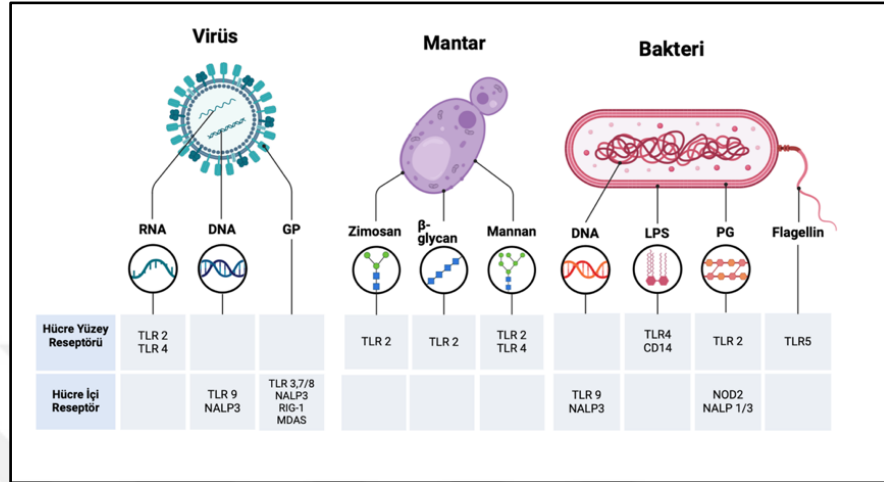
2.2 Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sistemi bakteri, virüs ve mantar gibi patojenlere karşı vücudumuzu korumakla görevlidir (99). Kendi içinde doğuştan gelen bağışıklık ve sonradan kazanılan bağışıklık olarak iki alt dala sınıflandırılır. Bu iki farklı alt dal içerisinde birçok farklı hücre ve molekül yüksek uyum içerisinde çalışarak vücudu korur (99,100).

2.2.1 Doğuştan gelen bağışıklık

Vücuda giren patojenlerin ilk karşılaştığı bağışıklık hücreleri ve molekülleri doğuştan gelen bağışıklık sistemine aittir (100). Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri olan doğal katil hücreleri, bazofiller, fagositler, dendrisitler, makrofaj hücreleri ve kompleman sistem molekülleri serumda dolaşarak bir bekçi gibi patojenleri tarar (100). Vücuda giren patojen ilk olarak bu sistemle karşılaşır ve durdurulmaya çalışılır. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri insanlarda bulunmayan, patojenlere ait bakterilere özgü lipopolisakkaritler, metillenmemiş DNA, mannoz-zengini oligosakkaritler gibi genel paternleri tanıyarak onları hedef alır (99). Genel hedefleri tanımları sebebiyle

çok spesifik değildirler ve patojenler bu sistemden kaçabilirler. Doğuştan gelen bağışıklık fonksiyonunu yerine getirirken salgılanan moleküllerle sonradan edinilen bağışıklık hücrelerini de tetikleyerek patojenlere karşı savaşı iletir (99,100).

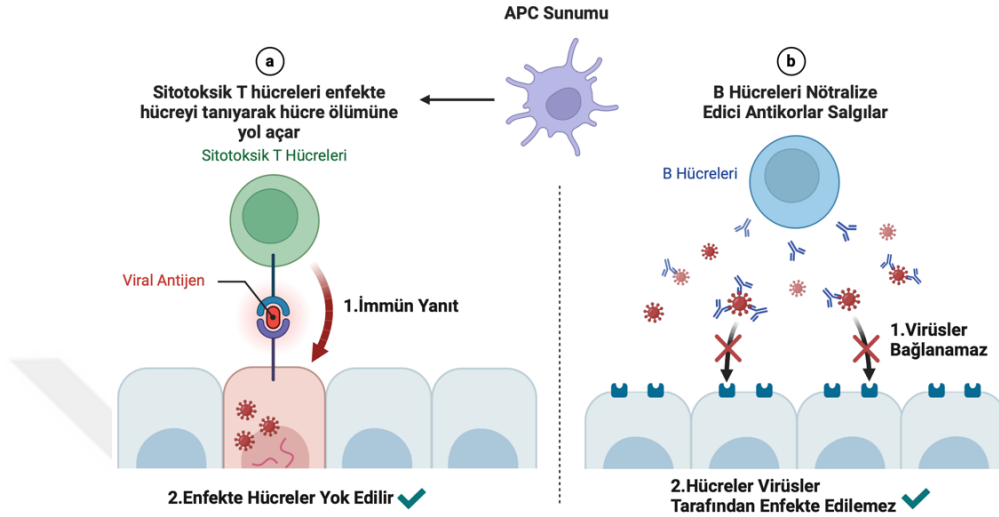


Şekil 5. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından tanınan paternler ve paternleri tanıyan reseptörler

2.2.2 Sonradan edinilen bağışıklık

Sonradan edinilen bağışıklıkta T ve B lenfositleri patojene ait spesifik antijenleri tanırlar ve elimine ederler. Doğuştan gelen bağışıklığın aksine edinilen bağışıklık hücreleri spesifik hedeflere saldırır ve uzun yıllar boyunca hedeflere yönelik hafızaya sahiptir. T hücreleri enfekte olmuş hücreleri çeşitli enzimler ve toksinlerle yok ederler (99,100). T hücreleri yapısal olarak patojenleri direkt tanıyamazlar, antijen sunucu hücreler tarafından patojenlerin antijenlerin kendilerine tanıtılmaları gerekmektedir (99). Bu tanıtım antijen sunucu hücreler tarafından gerçekleştirilir. dendritik hücreler, makrofajlar veya B hücreleri gibi antijen sunucu hücreler patojene ait antijeni küçük parçalar haline getirerek büyük doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülleriyle birleştirilerek T hücrelerine sunulur ve hücreler aktive olur. Aktivasyon sonrasında T hücreleri sitokin ve çeşitli molekülleri salgılayarak hem diğer bağışıklık hücrelerini tetikler hem de enfekte olmuş hücreleri toksinlerle elimine ederler (99,100).

B hücreleri T hücrelerinin aksine antijenleri kendileri tanıyabilirler (100,101). Antijenle karşılaştıktan sonra immunoglobulin olarak isimlendirilen glikoproteinleri salgırlar. İmmunoglobulinler üzerinde en çok çalışılmış glikoproteinlerdir (17,101).



Şekil 6. T ve B hücrelerinin patojenlere karşı yanıt oluşturma süreçleri

2.2.2.1 İmmunoglobulinler

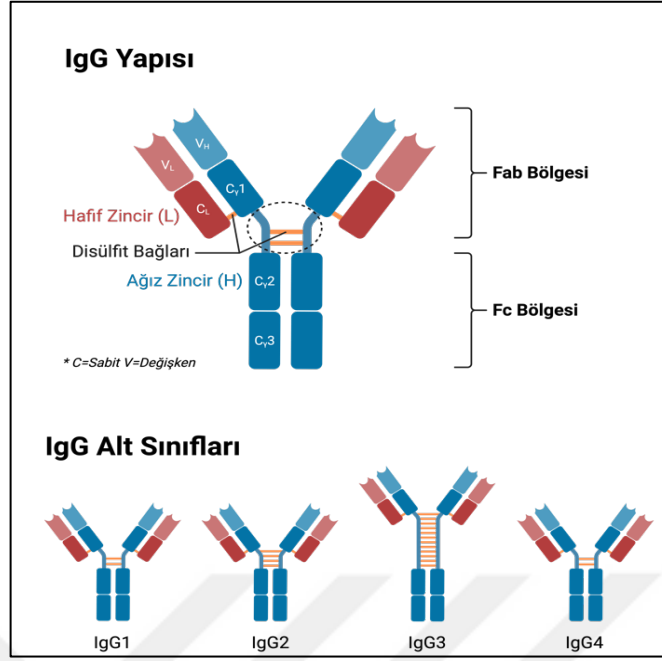
İmmunoglobulinler veya sık kullanılan isimleriyle antikorlar B hücreleri tarafından antijenlere karşı üretilen glikoproteinlerdir (16,101,102). Antikorlar antijenlere bağlanıp nötralize etme, diğer immün hücreleri için patojeni işaretleme, kompleman sistemiyle birlikte çalışarak patojenleri opsonize etme gibi farklı işlevlere sahiptir. Kendi içlerinde aminoasit sekanslarına göre İmmunoglobulin G (IgG), İmmunoglobulin A (IgA), İmmunoglobulin M (IgM), İmmunoglobulin D (IgD) ve İmmunoglobulin E (IgE) olarak 5 sınıfa ayrılırlar (17,18,103,104). Her bir immunoglobulin sınıfı farklı görevler üstlenir. İmmunoglobulin G (IgG) tüm patojenlere karşı aktif görev üstlenir. İmmunoglobulin A (IgA) daha çok mukus, gözyaşı gibi vücut sıvılarında görülür ve serum dışındaki IgA'ler dimerik haldedir. İmmunoglobulin M (IgM) patojene karşı ilk üretilen antikordur ve pentamerik yapıdadır. İmmunoglobulin E (IgE) bazofil ve mast hücreleriyle etkileşime girerek alerjik reaksiyonlarda görev alır. İmmunoglobulin D'nin (IgD) işlevi tam olarak bilinmemektedir (104) (Şekil 7)

						
Fonksiyonlar	IgD	IgE	IgM	IgA	IgG	
Nötralizasyon	---	---	+	++	++	--- Etkisiz
Opsonizasyon	---	---	+	+	+++	+ Etkili
Doğal Katil Hücreleri için Hedef Haline Getirme	---	---	---	---	++	++ Yüksek Etkiye Sahip
Mast Hücreleri için Hedef Haline Getirme	---	+++	---	---	+	+++ Güçlü Etkiye Sahip
Kompleman Sistemi Aktifleştirme	---	---	+++	+	++	

Şekil 7. İmmünglobulinlerin fonksiyonel özellikleri

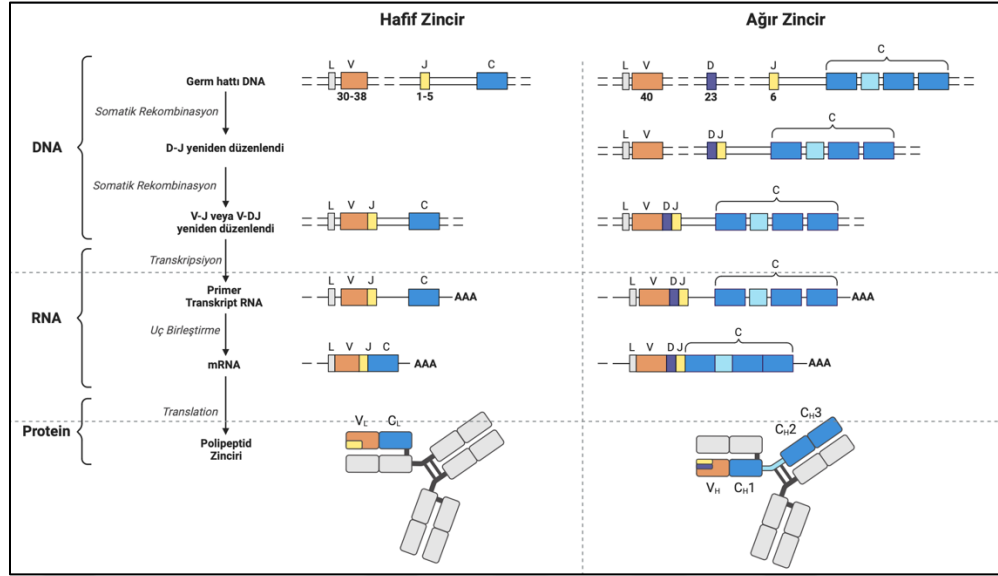
Bu sınıflar içerisinde serumda en yüksek miktarda görülen antikor IgG 'dir ve serum immunoglobulinlerinin %75'ini IgG'ler oluşturur(18). İmmünoglobulinler kendi içinde IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 şeklinde 4 farklı alt sınıfa ayrılırlar (Şekil 8). Her alt sınıf benzer fonksiyonlara sahip olsa da genel hedeflediği antijenler ve diğer immün hücreleriyle etkileşimlerinde farklılık gösterir (104). Serumda en yüksek miktarda görülen alt sınıf IgG1'dir ve sitotoksik hücreler ve fagosit hücreleriyle en yüksek etkileşime sahip sınıftır, IgG2 sınıfı daha çok bakteriyel enfeksiyonlara karşı üretilir, IgG3 sınıfı viral enfeksiyonlara karşı üretilirken IgG4 sınıfı alerjik reaksiyonlar ve otoimmün hastalıklarda etkin rol oynar(104).

Yapısal olarak Y şeklinde olan IgG 50 kDa moleküler ağırlıkta 2 ağır zincir ve 25 kDa moleküler ağırlıkta 2 hafif zincirin disülfid bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşur(105). Bu yapı bağlanma bölgesine (Fab) ve kristalizasyon bölgesine (Fc) sahiptir. Bağlanma bölgesi protein, lipid, glikan gibi farklı yapıları antijenleri tanıyabilir. kristalizasyon bölgesi ise diğer immün hücreleri tarafından antikorun tanınmasını ve bağlanmış olduğu antijenin düşman olarak görülmesini sağlar(104,105).



Şekil 8. IgG yapısı ve IgG alt sınıfları

Bağlanma bölgesi içindeki kısa sekanslı belirli alanlar, CDR (Complementarity Determining Region- Tamamlayıcı Belirleyici Bölge) adı verilen kısımları içerir (17,18,103). Bu bölgeler, antijenlerin spesifik kısımlarına bağlanır ve bu şekilde antijenlerin tanınmasını sağlar. CDR'ler, antikorların yüksek derecede çeşitlilik gösteren antijenlere yanıt vermesini sağlar. Bu çeşitliliği sağlayan VDJ rekombinasyonu olarak adlandırılan bir süreçtir. B hücreleri antijenle karşılaştığında antikorların bağlanma bölgesini oluşturan Değişkenlik Bölgesi (V), Bağlantı Bölgesi (J) ve Çeşitlilik (D) bölgesi genleri antijenin yapısına bağlı olarak rekombinasyona uğrayarak çeşitlilik kazanır ve bu sayede milyonlarca farklı antikoru üretilmesi sağlanır (16–18,103–105) (Şekil 9).



Şekil 9. VDJ rekombinasyonu ile antikor üretimi

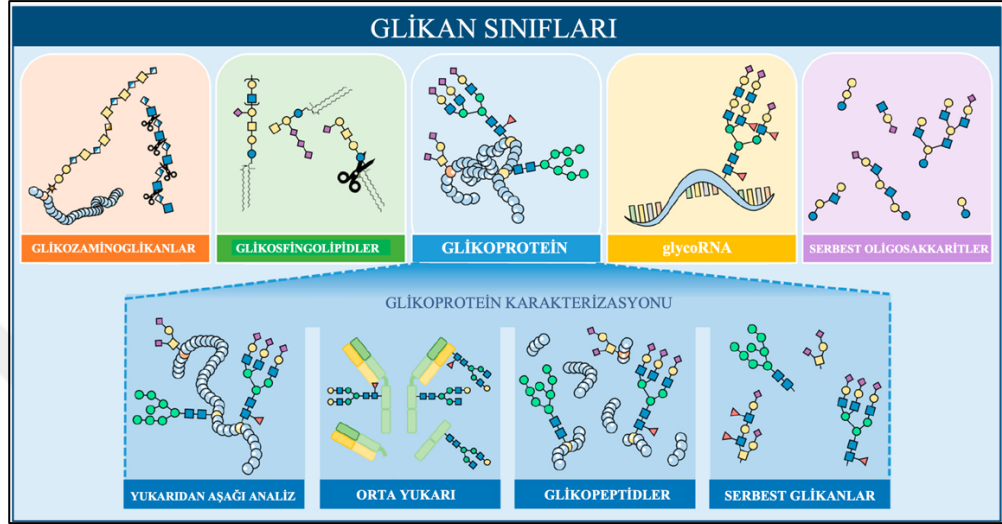
Fonksiyonel bölge olarak görülen Fc bölgesi, diğer immün hücrelerin üzerinde bulunan Fc reseptörleri tarafından tanınır ve onların antijene karşı yanıt oluşturmalarını sağlar. Bu reseptörlerden FcγRI (CD64) monositlerde, makrofajlarda ve nötrofillerde bulunurken, FcγRII (CD32) B hücreleri, nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler ve bazı lenfositlerde bulunur (18,101,102).

Antikorların %80'i Fc kısımlarının 297'nci asparajin aminoasitinden (Asn297) glikozillenir (106). Reseptörler bu glikozillenme bölgesini tanırlar ve yanıt oluştururlar. Bu tanıma sonrası Antikora Bağlı Hücresel Sitotoksinite (antibody dependent cellular cytotoxicity-ADCC), Antikora Bağlı Hücresel Fagositoz (antibody dependent cellular phagocytosis-ADCP) yolları tetiklenerek patojenler yok edilir (107–109).

2.3 Glikozilasyon

Glikanlar yaşam için esas olan 4 makromolekülden biridir (110). Yapısal ve fonksiyonel olarak birçok farklı görevde yer alırlar. Bunlardan en temel olanları enerji sağlanması, enerji saklanması, hücre-hücre etkileşimlerinin sağlanması, hücrelerin dış zarlarını oluşturarak koruma gibi görevlerdir (111). Bu birincil fonksiyonların yanında yüksek ökaryotlarda glikanlar, glikobiyojisi terminolojisinde aglikan olarak

isimlendirilen ikincil biyomoleküllere (protein, lipit vb.) bağlanarak fonksiyon ve yapılarını değiştirirler. Lipitlere bağlanarak lipopolisakkaritleri, proteinlere bağlanarak glikoproteinleri oluştururlar. Güncel çalışmalarda RNA'ya da glikanların bağlandığını göstermektedir (111,112) (Şekil 10).

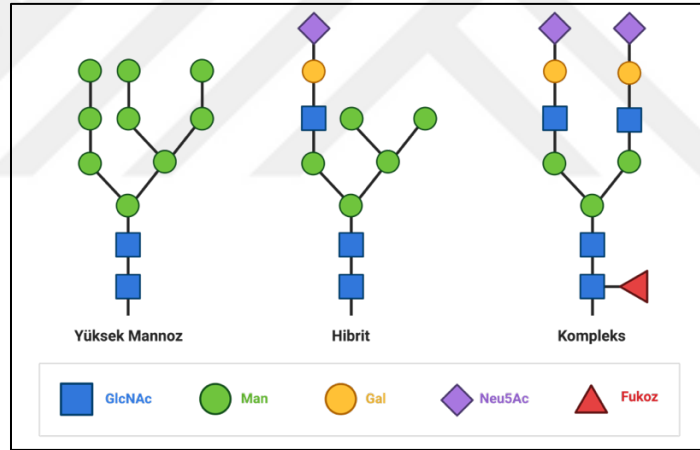


Şekil 10. Glikozillenene moleküller, glikan sınıfları ve glikoprotein karakterizasyon yaklaşımları (113)

İnsan proteinlerinin büyük çoğunluğu sentezlendikten sonra posttranslasyonel modifikasyona uğrarlar ve bu modifikasyonlar proteinlere işlevlerini kazandırır (20,111). Glikozilasyon en sık görülen modifikasyon türüdür. Serum proteinlerinin %80'i glikoproteinlerdir. Glikanlar proteinlerin aksine herhangi bir kalıp üzerinden kodlanmazlar. Birden fazla glikoziltransferaz enziminin çalışmasıyla proteinlere bağlanırlar (20,21). Protein glikozilasyonu glikanların aminoasitlerin üzerindeki atomlara bağlanmalarına göre farklı şekillerde gerçekleşir. Bunlardan en bilinenleri O-bağlı glikozilasyon ve N-bağlı glikozilasyondur. O-bağlı glikozilasyon aminoasitlerin yapılarında bulunan oksijen atomu üzerine bağlanır. N-bağlı glikozilasyon ise azot (N) atomu üzerine bağlanarak gerçekleşir (106,111).

2.3.1 N-Glikozilasyon

N-Glikozilasyon proteinlerin asparajin aminoasitlerinin azot atomu üzerine bağlanmalarıyla gerçekleşir. N-Glikanlar proteinler üzerindeki korunmuş Asparajin-X-Serin/Tireyonin (N-X-S/T)-X prolin hariç- sekansına bağlanırlar (111). Tüm N-Glikanlar temel bir çekirdek yapıya sahiptir. Bu temel yapı mannozdan oluşan bir çekirdeğin üzerine yan yana iki N-asetil-glukozamin (GlcNAc) bağlanmasıyla oluşur. Bu çekirdek yapı oluştuktan sonra farklı glikan yapıları bağlanarak çeşitlenmeler gerçekleşir. N-glikanların yapı çeşitlenmeleri içerdikleri monosakkarit yapılara göre yüksek mannozlu, hibrit ve kompleks olarak üç sınıfa ayrılır. Bu gruplar, fukoz (Fuc), siyalik asit (Neu5Ac), galaktoz (Gal), mannoz (Man), N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve N-asetilgalaktozamin (GalNAc) olmak üzere altı tip şeker kombinasyonu ile oluşturulurlar (111,114).

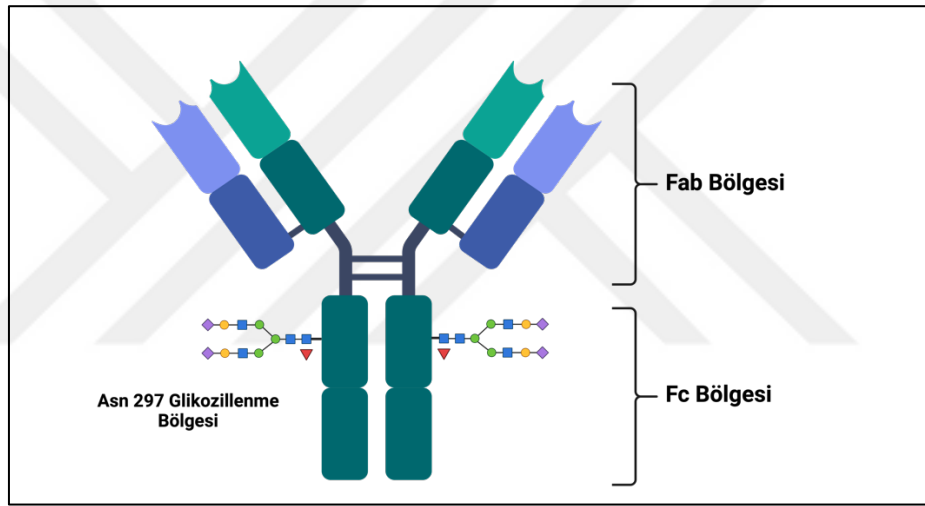


Şekil 11. Glikozilasyon sınıfları

N-Glikan biyosentezi, öncül glikanın üretimi, yapıya bağlanma, düzenlenme ve olgunlaştırma olmak üzere dört farklı mekanizmayla kontrol edilir. Öncü molekül türetilirken, oligosakaritler N-asetilglukozamin (GlcNAc), mannoz (Man) ve glukoz (Glc) içeren bir şeker çekirdek yapısı oluşturur. Ardından, bu şekerler endoplazmik retikulum (ER) membranına gömülü dolikol lipid taşıyıcısına eklenir. Öncü glikan ve proteinin bağlanması ER içinde gerçekleşir ve ardından ER ve golgi'de glikan olgunlaştırma işlemi başlar. Golgi cisimi, spesifik enzimleri depolar ve kompleks, hibrit ve yüksek mannozlu türler oluşturmak için enzimatik aktivitenin başlangıç

bölgesidir. Bu süreçte, GlcNAc ve Glc'nin eklenmesi ile çekirdek bölge oluşturulurken, dallanma işlemi GlcNAc'nin çekirdek mannoz birimleri ile bağlanması ile devam eder. Bu sentez süreci proteinin üzerindeki glikozilasyon bölgelerine göre birden fazla bölgede gerçekleşir (111,112,114).

İmmünoglobulin G her bir ağır zinciri üzerinde korunmuş bir glikozilasyon bölgesine sahiptir (108). Kristalizasyon bölgesinde (Fc) 297'nci aminoasit olan Asparajin aminoasiti üzerinden antikorlar glikozillenir. Fab bölgesinden glikozillenen antikorlar raporlanmış olsa da immünoglobulinlerin %80'i Fc bölgelerindeki bu sekans üzerinden glikozillenerek fonksiyon kazanırlar (23,107,108,115–117).

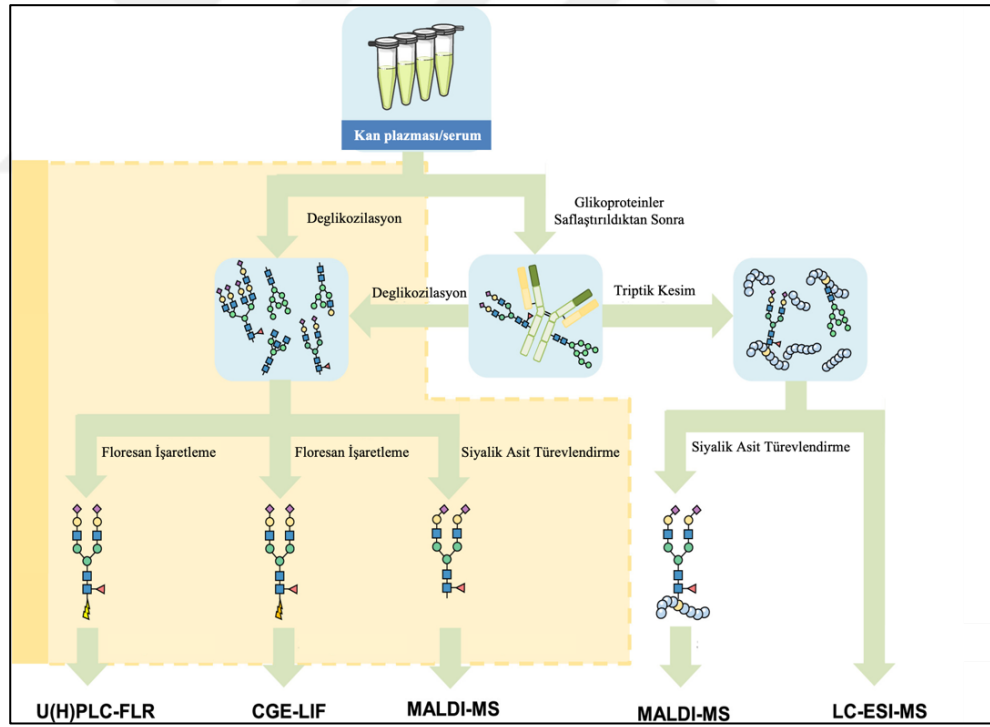


Şekil 12. Glikozilenmiş bir antikor yapısı

Glikozilasyon motifleri bir sekansa dayalı oluşmadığı için endoplazmik retikulumun durumu hücresel stres durumları, hücre proteinleri, glikan öncüllerinin varlıkları gibi durumlara göre değişiklik gösterebilirler. Bu moleküler değişiklikler de insanların hastalıkları, stres durumları, yaşları (118), cinsiyetleri(119), bağlı oldukları popülasyon gibi özelliklere göre etkilenirler (120–122). Bu etkilenme durumları glikanların çeşitli hastalıklar için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştü ve çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan çalışmalarda çeşitli kanserlerin (28–34,119,123–125), otoimmün hastalıkların (25,27,126–128), nörodejeneratif hastalıkların belirlenebildikleri (23,129–132) görülmüştür. Bu motifler çeşitli yöntemlerle analiz edilebilirler.

2.3.2 Glikomiks analizler

Glikomiks, bir hücre veya dokudaki tüm glikanların sistemli analizini ifade eder (133). Hücre veya dokulardaki belirli proteinlerin glikomiks analizi için, bu moleküller öncelikle ilgili dokudan veya hücreden izole edilmelidir. Daha sonra, seçilen yöntemlere uygun olarak analizler gerçekleştirilir. Glikomiks çalışmaları, çeşitli yaklaşımlarla yürütülebilir. Bazı yaklaşımlar, proteinlerin enzimatik kesimlerle küçük peptidlere ayrılmasını veya daha büyük yapıların kesilmesini içerir. Ancak, en yaygın kullanılan yaklaşım, serbest glikan analizidir. Bu yaklaşımda, öncelikle seçilen protein izole edilir. Ardından enzimatik reaksiyonlar ya da kimyasal reaksiyonlarla proteinden koparılır. Glikanlar zenginleştirilir. Sonrasında uygulanılacak analiz yöntemine göre glikanlar doğal koşullarında bırakılarak ya da çeşitli kimyasallarla muamele edilerek analize uygun hale getirilir ve analiz edilir(113).



Şekil 13. Farklı metotlarla yapılan glikan analizlerinin iş akışları (113)

2.3.2.1 Antikorların zenginleştirilmesi

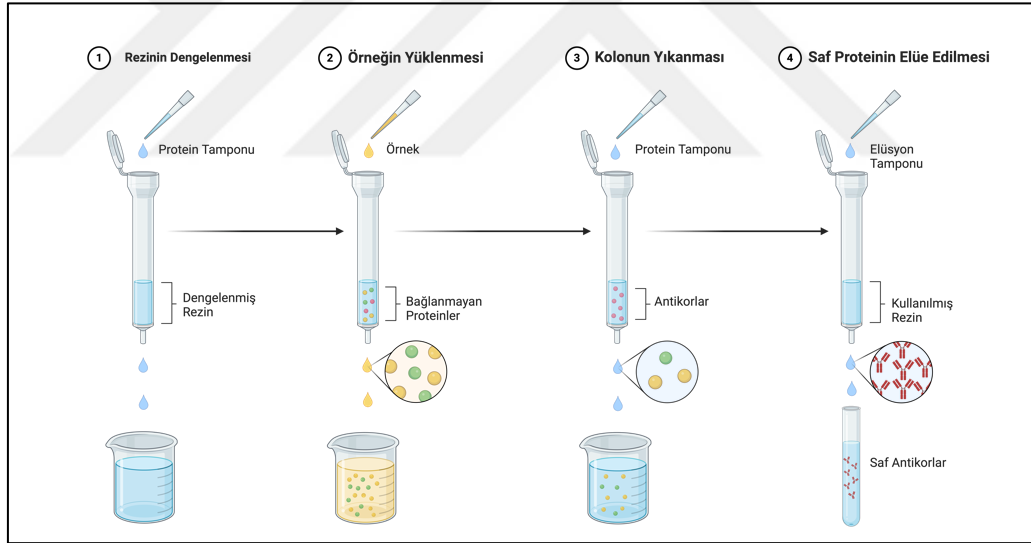
Antikorların serbest glikan analizi için öncelikle antikorlar izole edilmelidirler. Bu izolasyon genellikle afinite kromatografisi teknikleriyle gerçekleştirilir (134). Afinite kromatografisi temelde izole edilecek molekülün ilgi duyduğu moleküllerin kaplandığı rezinlerle antikor içeren doku/vücut sıvısının muamele edilmelerine dayanır. Sıvılarla muamele edildikten sonra proteinler rezine bağlanır ve bu güçlü bağlanma ph'nın düşürülmesiyle bozularak izole edilir (135) (Şekil 14).

Bu rezinler agaroz ve silika gibi polimer yapılar içerir. Bu polimerlere antikorların ilgi duyacağı ligandlar bağlanmıştır. Antikor izolasyonu için sık kullanılan üç ligand vardır. Bunlar Protein A, Protein G ve Protein L olarak isimlendirilirler ve üçü de farklı canlılardan izole edilmiş yüzey reseptörleridir. Bu yüzey reseptörleri antikorların farklı bölgelerine ve farklı antikor varyantlarına ilgi duyarlar. Protein A ve Protein G antikorların Fc bölgelerine bağlanırken Protein L Fab kısımlarına bağlanır. Bu sayede tam antikor ya da Fc bağlanarak modifiye edilmiş protein, antikor yapıları Protein A ve G rezinleri kullanılarak izole edilebilir. Protein L rezini ile Fab yapılar ve tek zincir fragman değişken (scFv) kısmi antikor yapıları izole edilebilir. Bu rezinlerin farklı immunoglobulin varyantlarına ilgi duymaları sebebiyle izole edilecek varyanta uygun seçilmelidirler. Protein G insan immunoglobulinleri içerisinde sadece IgG varyantına ilgi duyduğu için IgG analizlerinde kullanımı en uygun rezindir(135).

Protein G'ye benzer şekilde CaptureSelect FcXL rezini sadece insan IgG'lerinin Fc bölgesine ilgi duyar. Bu rezin Camelidae'lerin VHH yapılarından türetilmiş ve st *Saccharomyces cerevisiae*'de üretilmiştir (136).



Şekil 14. Tez çalışmasında kullanılan spin kolonlar



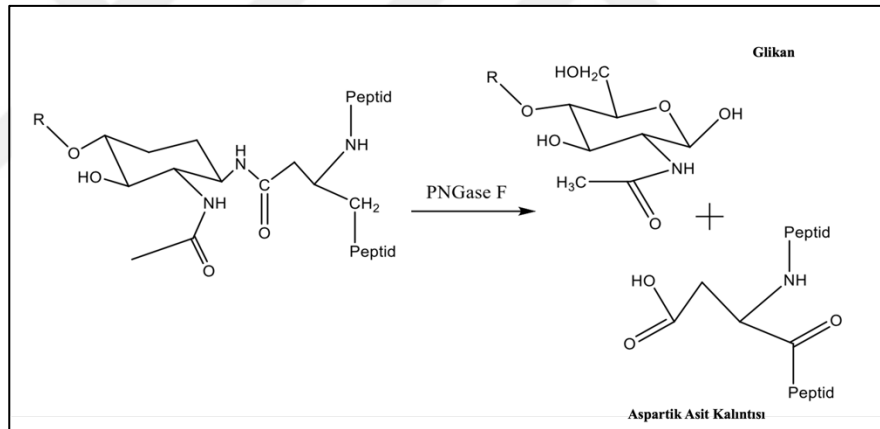
Şekil 15. Antikor saflaştırma sürecine ait iş akışı

2.3.2.2 Antikorların deglikozilasyonu

İzolasyon sonrası antikorlar deglikolize edilerek serbest kalan glikanlar analiz edilir. Bu amaçla kimyasal ya da enzimatik yöntemler kullanılabilir.

Kimyasallardan en sık kullanılanı hidrazindir. Hidrazin ile O- ve N-glikanların ayrışma sıcaklıklarının farkı kullanılarak glikanlar koparılabilir. O-glikanlar 60 °C’de N-glikanlar ise 95 °C’de koparlar. O-Glikanların proteinler üzerinde korunmuş bir bağlanma sekansı bilinmediği ve O-Glikanların tamamını koparabilen bir enzim keşfedilemediği için bu yöntem daha çok O-Glikan analizinde ya da hem O- hem N-Glikozilasyonu görülen proteinlerin glikan motiflerini analiz etmek için kullanılır(137,138).

N-Glikan analizinde endoglikozidazlar, glikanların yapılarına zarar vermedikleri için sıklıkla kullanılır. Bunların içinde en sık kullanılan enzim ise 314 aminoasitten oluşan ve 35.500 moleküler ağırlığa sahip bir glikozidaz olan Peptid-N- glikozidaz F (PNGase F)’dir. Bu enzim alfa 1,3-fukoz hariç, tüm N-Glikan bağlarını keserek glikanları serbest bırakır (113,139)(Şekil 15).

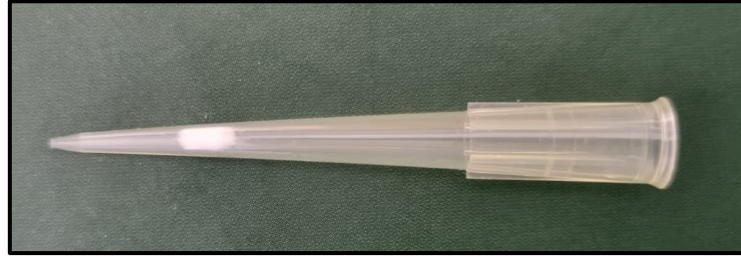


Şekil 16. PNGase F enzim reaksiyonunun şematik gösterimi

2.3.2.3 Glikanların zenginleştirilmeleri

Glikanlar serbest bırakıldıktan sonra analiz için zenginleştirilmeleri ve ortamdaki proteinlerin, tamponların ve tuzların analiz sürecinde kromatografik sistemleri ve kütle spektroskopisinde oluşacak iyonlaşma problemlerini engellemek için uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için sıklıkla gözenekli grafitlenmiş karbon (PGC) veya katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemi kullanılır. Bu yöntemler ticari olarak alınan kitler ve kolonlarla yüksek miktarda örnekle aynı anda yapılabilir (140).

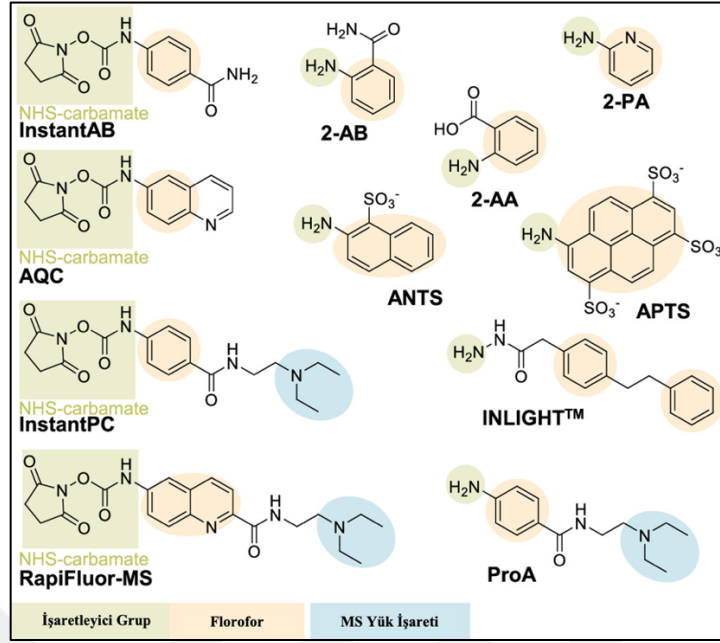
Wuhrer ve arkadaşlarının (141) geliştirdiği pamuk ve pipet ucuyla yapılan yeni bir yöntem de literatürde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem çok sayıda örnekle çalışmak için uzun sürse de diğer yöntemlere göre çok daha ucuz olması sebebiyle tercih edilmektedir.



şekil 17. Tez çalışmasında kullanılan, pamuk ve pipet ucu ile oluşturulan glikan zenginleştirme kolon sistemi

2.3.2.4 N-Glikanların işaretlenmesi ve türevlendirilmesi

Glikanlar analiz edilmeden önce çeşitli sebeplerle işaretlenebilir ya da kimyasal reaksiyonlarla trevlendirilebilirler. Bu işaretlemeler kullanılacak tekniklere göre değişkenlik gösterebilir. Glikanlar UV dalgaboyunda ışıma yaratmaması sebebiyle kromatografik ve kapiler elektroforetik tekniklerle glikanlar analiz edilecekleri zaman floresan boyalarla işaretlenir ve sistemlere bağlanmış floresan detektörlerle analiz edilirler. Bu boyalardan en bilinenleri kromatografik sistemler için 2-aminobenzamit (2-AB), 2-aminobenzoik asit (2-AA), 2-aminopiridin (PA), kapiler elektroforez sistemleri için 2-aminonaftalen trislfonik asit (ANTS) ve 1-aminopiren-3,6,8-trislfonik asit (APTS)'tir (142,143) (şekil 17).



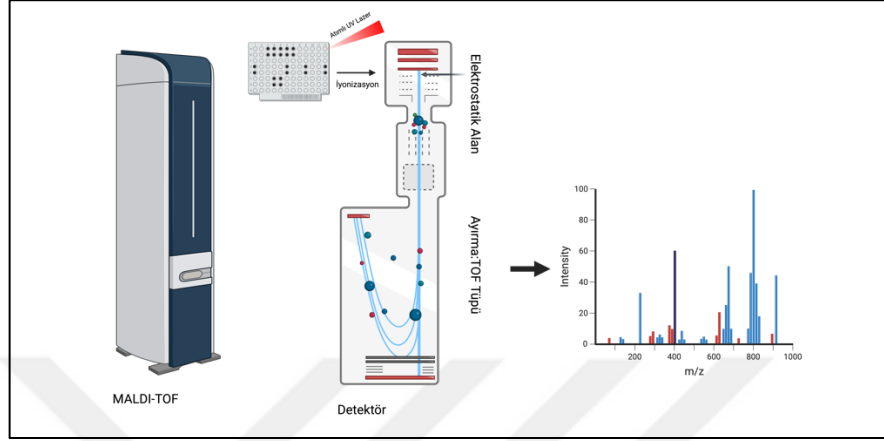
Şekil 18. En sık kullanılan floresan işaretleyici moleküller (113)

Kütle spektroskopisi teknikleriyle glikanlar analiz edileceği noktada ise farklı türevlendirme yaklaşımları sergilenir. Kütle spektroskopisi temelde moleküllerin bir iyonlaştırma kaynağı ile gaz fazına getirilip iyonlaştırıldıktan sonra kütle/yük (m/z) değerlerine göre analiz edilmelerine dayanır. Glikan analizlerinde sıklıkla Elektrosprey İyonizasyon (ESI-MS) ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) iyonizasyon yöntemleri kullanılır (144).

2.3.2.5 N-Glikanların MALDI-TOF ile analizi

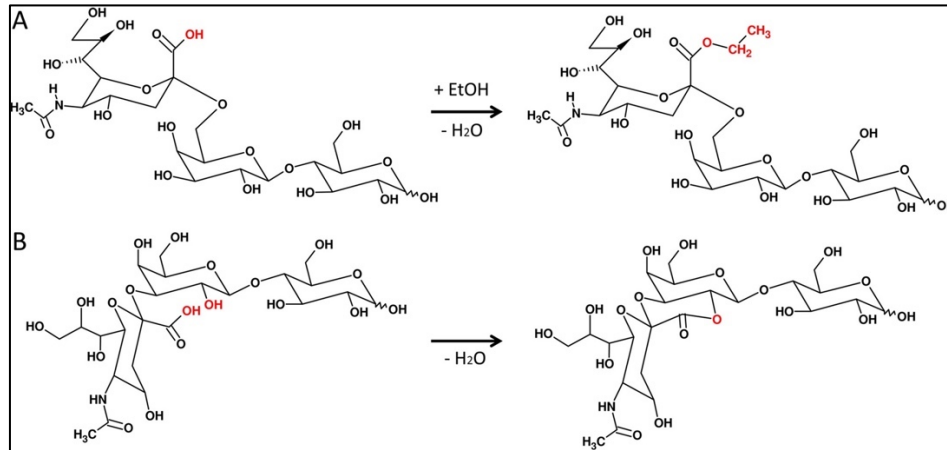
MALDI iyonizasyon tekniği sıklıkla Uçuş Zamanlı (TOF) kütle spektroskopisiyle birleştirilerek kullanılır. Uçuş zamanlı kütle spektroskopisinde iyonlar manyetik bir alan içerisinde uçuşurlar ve kütle/yük oranlarına göre uçuş süreleri değişiklik gösterir. Bu süre farkı ölçülerek analiz edilir. MALDI-TOF sistemlerinde MALDI kısmı ile örnek iyonlaştırılır TOF kısmı ile iyonlar analiz edilir (145). Bu sistemde glikanların analizi pozitif iyon modunda gerçekleştirilir. Fakat siyalik asitler yapıları gereği negatif iyonlaşırlar ve MALDI iyonlaşma tekniğiyle iyonlaştırıldıklarında stabilitelerini kaybederler. Siyalik asitleri analiz sırasında stabil halde tutabilmek ve pozitif iyon modunda düşük iyonlaşmalarını azaltarak analizde varlıklarını belirleyebilmek amacıyla türevlendirilir. Türevlendirmenin çeşitleri

vardır, bunlar bağlara özgü ve bağlara özgü olmayan türevlendirmeler olarak ayrılır. Bağlara özgü olmayan türevlendirmelerden en bilinenleri basit esterifikasyon ve amidasyondur (146,147).



Şekil 19. MALDI-TOF sisteminin çalışma prensibi

Bu türevlendirme teknikleri α -2,3 ve α -2,6 bağlı siyalik asitlerde işlevsiz kaldığı için bağlara özgü türevlendirme teknikleri kullanılmaktadır. En sık kullanılan teknik ise etil esterifikasyondur. Etil esterifikasyonda glikan örnekleri etanol içerisinde çözülmüş EDC/HOBt kimyasallarıyla muamele edilerek türevlendirilir ve MALDI tabakasına spotlanarak örnekler analiz edilir (144,146–150) (Şekil 19).



Şekil 20. Etil esterifikasyon reaksiyonu

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri, malzemeler, kimyasallar ve solüsyonlar verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan sarf ve kimyasallar

Sarf ve Kimyasal	Marka/Model
Mini Spin Kolon	Epoch Life Sciences
CaptureSelect FcXL Matrisi	Thermo Scientific Fisher
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Sigma
LC-grade su	Merck
Asetik asit	Sigma
Etanol	Merck
Asetonitril	Merck
Peptid Kalibrasyon standardı (MALDI)	Bruker Daltonics
PNGase F	New England Biolabs (NEB)
PNGase F Denatürasyon Tamponu	New England Biolabs (NEB)
PNGase F GlycoBuffer	New England Biolabs (NEB)
%10 NP-40	New England Biolabs (NEB)
EDC (1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)	Thermo Scientific Fisher
Hydroxybenzotriazole (HOBt)	Sigma
Trifloroasetik asit (TFA)	Sigma
Super DHB(SDHB)	Bruker Daltonics

Tablo 1. Çalışmada kullanılan sarf ve kimyasallar (Devam)

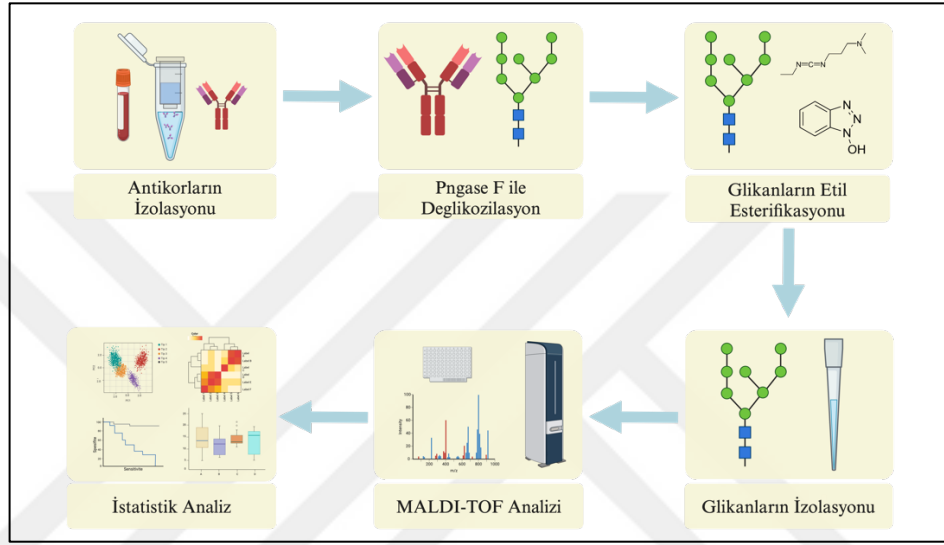
A-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA)	Bruker Daltonics
Pamuk	Watsons
MTP Çelik Hedef Plaka (Ground Steel)	Bruker Daltonics

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve firmaları

Cihaz	Marka/Model
MALDI TOF Kütle Spektrometresi	Bruker Rapiflex TM
Laminer Kabin	Heraeus Instruments Lamin Air
Derin Donduruculu Buzdolabı (+4 C ve- 20 C)	Arçelik, Indesit
Derin dondurucu (-80C)	VWR symphony
Hassas Analitik Terazî	Ohaus PIONEER
pH Metre	Mettler Toledo
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	Eppendorf
Santrifüj	Eppendorf
Çalkalayıcı	Eppendorf Thermomixer C
UV Spektrometre	Thermo Nanodrop One C
PZR Cihazı	Bio-Rad
Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Çalkalayıcı	Innova

3.2 Yöntemler

Çalışma içerisinde Serum ve BOS örneklerinden immunoglobulinler zenginleştirilmiş, deglikolize edilmiş, glikanlar türevlendirilmiş, zenginleştirilmiş, MALDI-TOF MS ile analiz edilmiş, veri analizleri yapılmış ve istatistik analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 21. Tez çalışmasının şematik gösterimi

3.2.1 Etik kurul izni ve örneklerin sınıflandırılması

2016-2017 yılları arasında Acıbadem Sağlık Grubu Laboratuvarı'na İzoelektrik Fokuslama Analizi (IEF) için gönderilmiş serum ve beyin omurilik sıvıları (BOS) analiz edildikten sonra MALDI-TOF analizine kadar -80°C 'de saklandı. Örnekler Labmed veritabanı kullanılarak IEF sonuçlarına göre sınıflandırıldı.

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi İnsan Bilimsel ve Etik İnceleme Komitesi (Onay No:2022-11/28) çalışmanın yürütülmesini onayladı.

3.2.2 İmmunoglobulin G zenginleştirme

Serum ve BOS örneklerinden spin kolonlarla immünoglobulin (IgG) zenginleştirildi. Serum örnekleri 1:5 oranında, BOS örnekleri 1:5 oranında PBS ile dilüe edildi. 10 µL CaptureSelect FcXL matris spin kolonlara eklendi. Matris 2 kez 100 µL ddH₂O eklenip spinlendi. 2 kez 100 µL PBS eklendi ve matris dengelendi. Spin kolonun alt kısmı parafilm ile kapatıldı. Dilüe edilmiş örnekler kolona eklendi. Kolon 600 rpm hızla 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası parafilm çıkarıldı ve spinlendi. Matris 2 kez 100 µL PBS eklenerek yıkandı. İmmunoglobulin 100 mM Asetik Asit ile elüe edildi ve 1M Tris eklenerek pH yükseltildi ve protein miktarı A280 ölçümü ile belirlendikten sonra analizler gerçekleştirilene kadar -20 °C’de saklandı.

3.2.3 Serum ve BOS’tan elde edilen immünoglobulinlerin deglikozilasyonu

Deglikozilasyon üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. İzole edilmiş antikor örneğinden 9 µL alındı ve 1 µL Denatürasyon Tamponu eklendi. Bu karışım 10 dakika boyunca 100°C’de kaynatıldı. Ardından, 2 µl GlycoBuffer, 2 µl %10 NP-40 ve 6 µL ddH₂O eklendi. Daha sonra 1 µL PNGase F eklendi ve 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örnekler etil esterifikasyon sürecine kadar -20 °C’de saklandı.

3.2.4 N-Glikanların etil esterifikasyon ile türevlendirilmesi

Etil Esterifikasyon Wuhler (150) ve arkadaşları tarafından geliştirilen metodla gerçekleştirildi. Prosedür laboratuvar altyapısına uygun olarak revize edildi. Deglikolize edilmiş örneklerden 2 µL alınarak 20 µL EDC/HOBt (250 mM EDC, 250 mM HOBt Etanol içerisinde) eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler zenginleştirildi.

3.2.5 Etil esterifiye edilmiş N-Glikanların zenginleştirilmesi

Esterifiye edilmiş glikanları içeren çözeltiden glikanlar hidrofilik etkileşime dayalı bir yöntemle saflaştırıldı. Protokol Selman (54) ve arkadaşlarının çalışması revize edilerek uygulandı. Protokole göre 200 µL hacimli micropipet uçlarına 0.2-gram pamuk yerleştirildi. Pipet uçları kapakları delinmiş 1.5 ml hacimli tüplerin içine yerleştirildi. 100 µL deiyonize su pipet uçlarının üzerine eklendi ve spinlendi. Pipet uçları mikropipete yerleştirilerek 5 kez deiyonize su ile pipetaj yapıldı ve spinlendi. Ardından %85'li asetonitril eklenip, spinlendi, 10 kez pipetaj yapıldı ve spinlenerek şartlandırıldı. Etil esterifiye edilmiş örnekler üzerine 20 µL asetonitril eklenerek dilüe edildi ve pipet uçlarının üzerine eklenerek spinlendi. Örnekler yavaş bir şekilde 20 kez pipetaj yapıldı. Pipetaj sonrası önce %0.1 TFA içeren %85 asetonitril ile 5 kez, ardından %85 asetonitril ile 5 kez pipetaj yapılarak kolonlar yıkandı. Yıkama sonrası 10 µL deiyonize su pipet uçlarına çekilerek 20 kez yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı ve türevlendirilmiş glikanlar elüe edildi.

3.2.6 MALDI-TOF MS analizi

Türevlendirildikten sonra zenginleştirilmiş örnekler Bruker Rapiflex MALDI-TOF MS sistemi ile analiz edildi. TA30 (%30 Asetonitril) içerisinde çözünmüş 5 mg/ml SDHB çözeltisine 1 mM NaCl ve %0.1 Trifloroasetik asit (TFA) eklenerek matris hazırlandı. Örnekler 1:1 oranında matris ile karıştırıldı. Karıştırılan matris/örnek çözeltisi her kuyuya 1 µL olacak şekilde her örnek çift tekrarlı olarak çelik hedef plaka (Bruker Daltonics) üzerine spotlandı. Oda sıcaklığında kristallenmesi beklendi. Kristallendikten sonra glikan profillemeye uygun lazer yoğunluğu ile pozitif iyonizasyon ve reflektör modunda MALDI-TOF MS kullanılarak yapıldı. Analizler öncesi MALDI-TOF peptid kalibrasyon standardı ile kalibre edildi. 1000 ila 3500 m/z aralığında veri alımı gerçekleştirildi.

3.2.6.1 MALDI-TOF MS sonuçlarının sayısal verilere dönüştürülmesi

MALDI-TOF-MS analizi sonucu elde edilen spektrumlar Flex Analysis yazılımı ile değerlendirildi. Türevlendirilmiş N-glikan yapılarının moleküler ağırlıkları literatür bilgisinden faydalanarak belirlendi. Moleküler kütlelerde sapma değeri ± 3 Da kabul edilerek N-glikanlara ait yoğunluk değerleri belirlendi. Elde edilen yoğunluk bilgileri Microsoft Excel kullanılarak tablo haline getirildi. Her spektrumda bulunan N- glikanların toplam yoğunluk miktarları belirlenmiş m/z değerindeki glikanın yoğunluk değerine bölündükten sonra bağıl bolluk değerleri hesaplandı. Glikanlar kimyasal yapılarına göre gruplandırıldı. İstatistik analizler glikanlar ve glikan gruplarına ait değerler üzerinden gerçekleştirildi.

3.2.7 İstatistiksel veri analizi

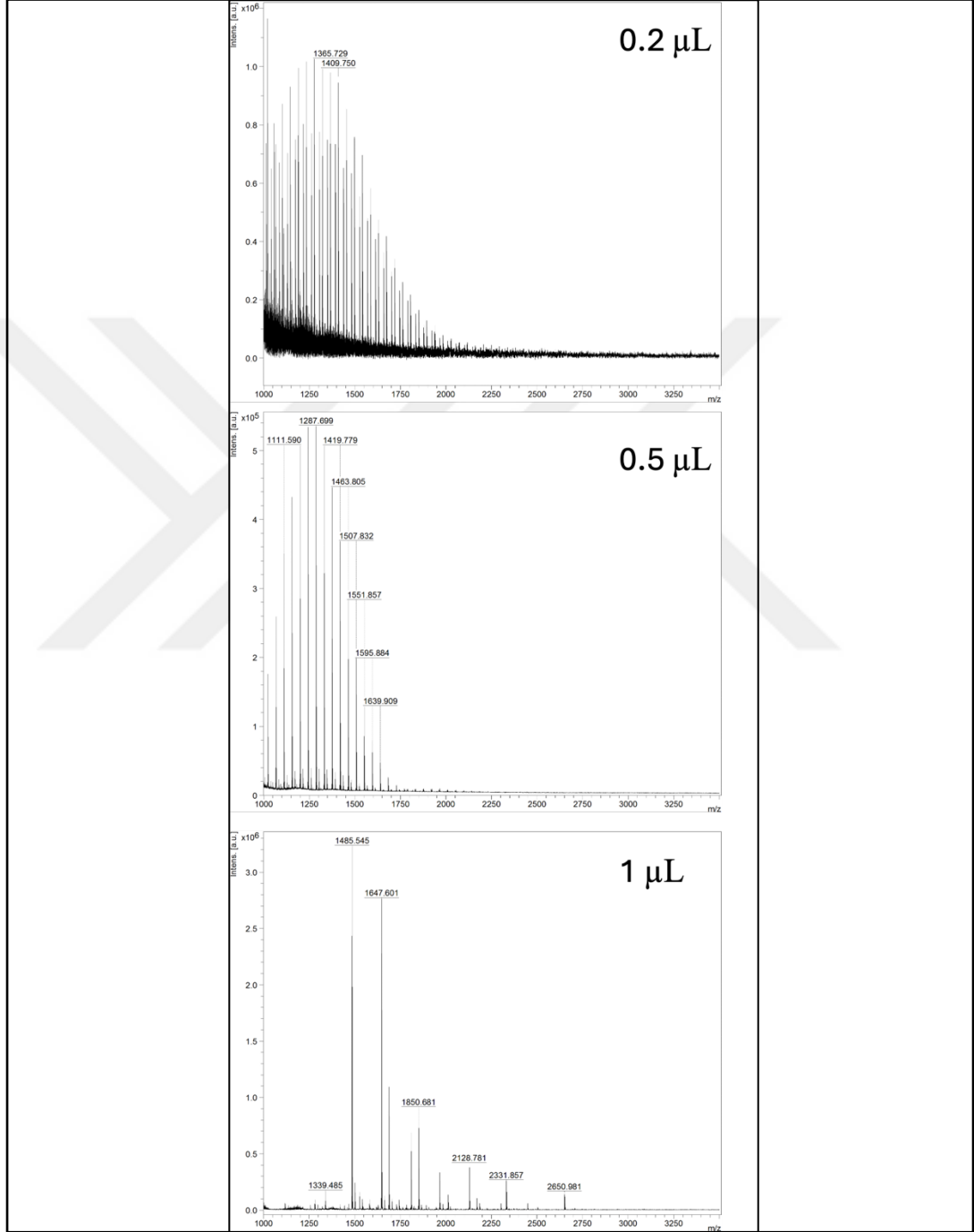
Örneklerin normal ve homojen dağılım durumlarını belirlemek için Shapiro-Wilk ve Levene testi uygulandı. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) uygulanarak $p < 0.05$ ve $p < 0.001$ olanlar anlamlı kabul edildi. Isı haritası, temel bileşen analizi (PCA) analizleri, ROC (Alicı işletim Karakteristiği) ve AUC (Eğrinin altında kalan alan), "Spearman" korelasyon analizleri yapıldı. İstatistik çalışmaları ve veri görselleştirmeler RStudio (versiyon 1.49, RStudio, Inc.) istatistik yazılımı ve Metaboanalyst (151) internet sitesi kullanılarak yapılmıştır. Tüm görseller Biorender.com internet sitesi kullanılarak çizilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan örneklere ait bilgiler

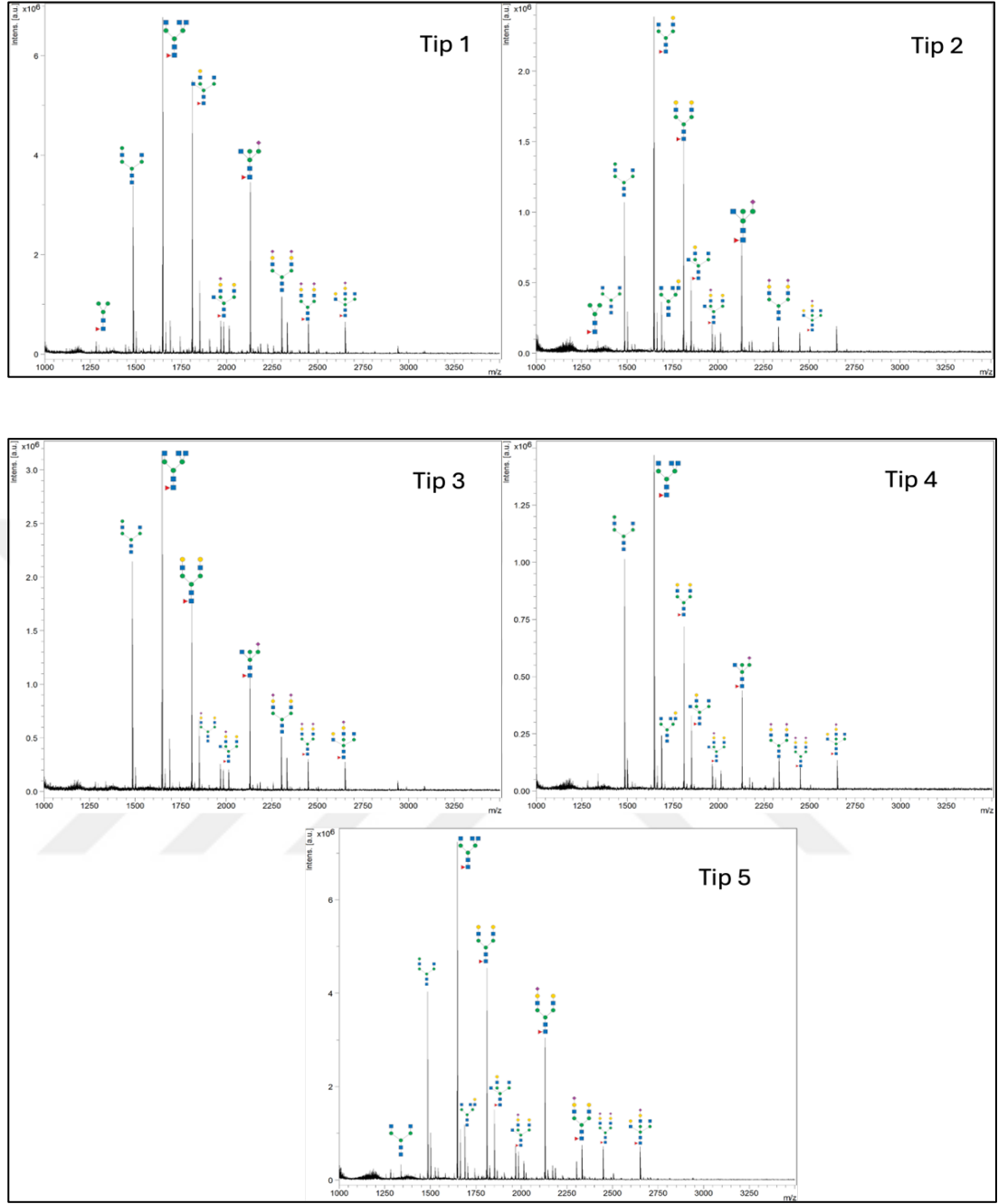
OKB Sonucu	Toplam Sayı	Kadın	Erkek	Yaş Aralığı
Tip 1	36	24 (%66,67)	12 (%33,33)	16-67 (37,39)
Tip 2	44	28 (%63,63)	16 (%36,36)	19-68 (37,28)
Tip 3	8	7 (%87,5)	1 (%12,5)	22-60 (37,48)
Tip 4	9	3 (%33,33)	6 (%66,67)	12-77 (38,28)
Tip 5	3	3 (%100)	0 (%0)	38-73 (45,94)

4 BULGULAR

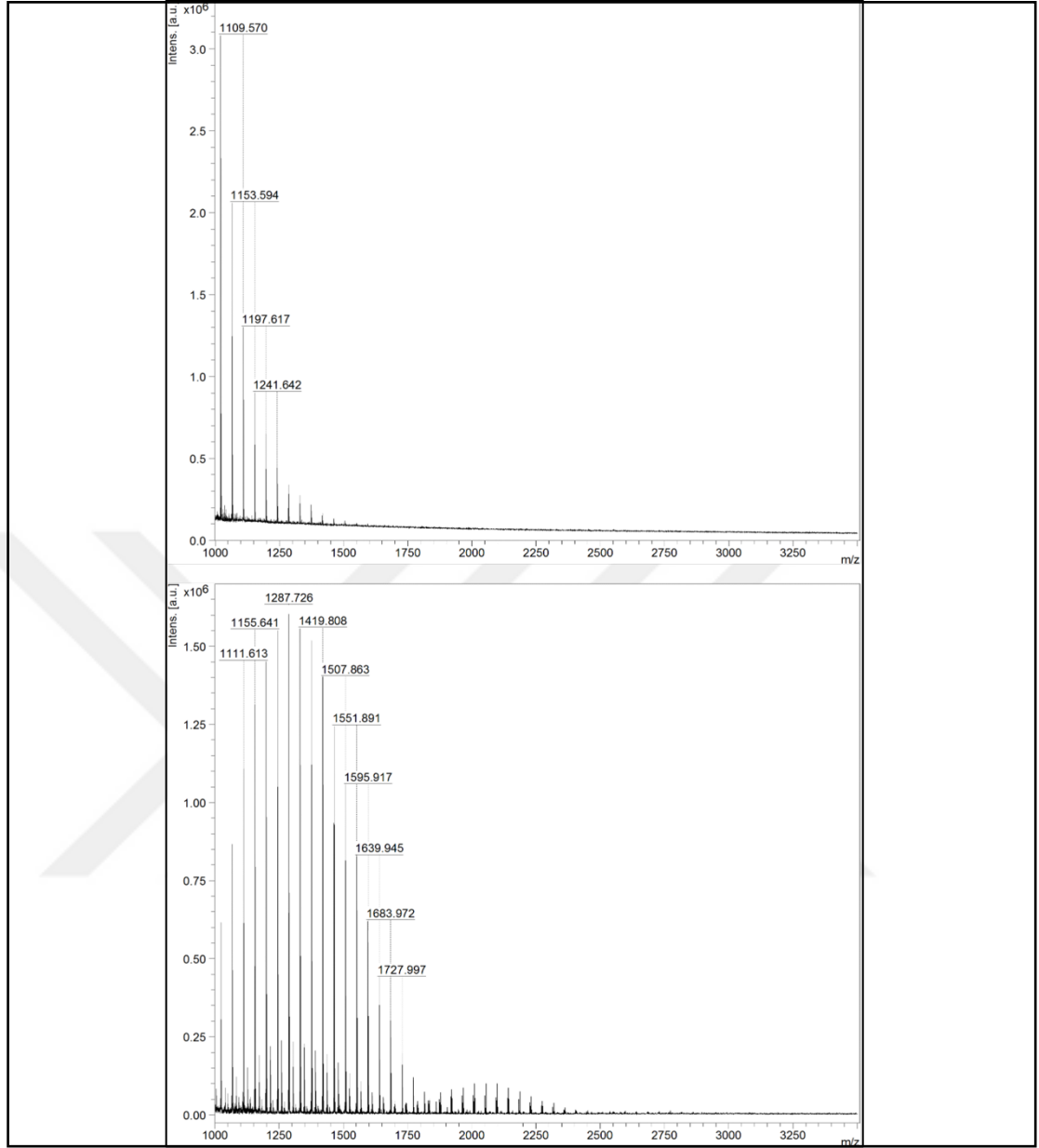
4.1 N-Glikanların MALDI-TOF Analiz Sonuçları



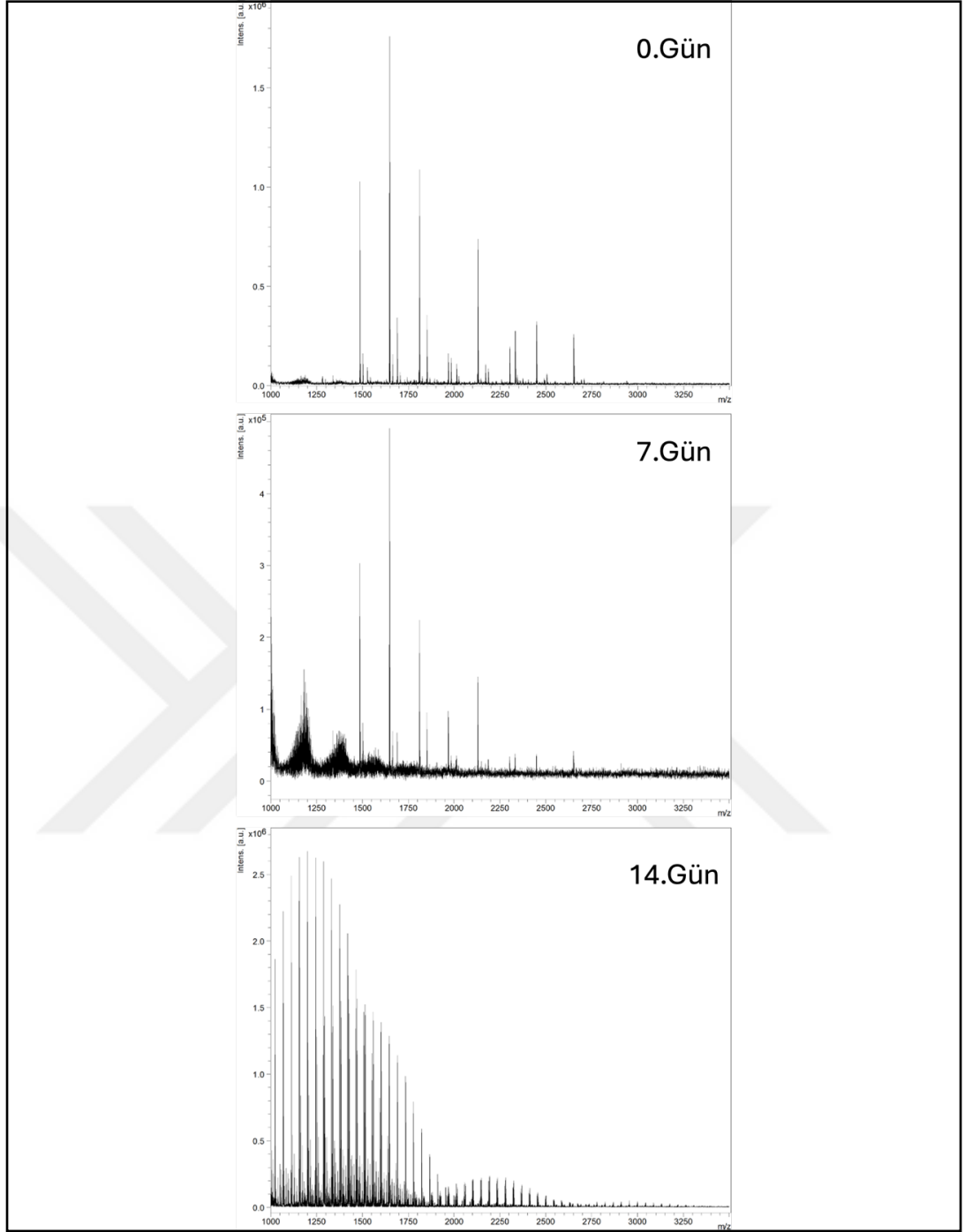
Şekil 22. Farklı PNGase F miktarlarıyla yapılan denemeler



Şekil 23. Oligoklonal bant sonuçlarına göre sınıflandırılmış serum örneklerinin MALDI-TOF MS spektrumları



Şekil 24. Beyin omurilik sıvısından izole edilen immünooglobulinler ile yapılan MALDI-TOF MS analiz sonuç örnekleri



Şekil 25. Seçilmiş bir örneğin etil esterifiye edildikten sonra -20 C'de 0, 7 ve 14.gün yapılmış analizleri

Analizler sonucunda örneklerin etil esterifiye edildikten sonra uzun süre -20 C'de saklanamayacağı belirlendi ve analizler bu bilgiye uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 4. Glikan grupları ve tanımlamaları

Grup ismi	Simge	Açıklama
GG1	M	Oligomannozik glikanlar
GG2	Hy	Hibrit Yapılı glikanlar
GG3	C	Kompleks yapılı glikanlar
GG4	A2	İki antenli glikanlar
GG5	B	Bisektik glikanlar
GG6	F	Fukozlanmış glikanlar
GG7	A2F	İki antenli fukozlanmış glikanlar
GG8	A2B	Bisektik iki antenli glikanlar
GG9	A2F0B	Bisektik iki antenli fukozlanmamış glikanlar
GG10	A2FB	Bisektik iki antenli fukozlanmış glikanlar
GG11	A2S	İki antenli siyalilasyona uğramış glikanlar
GG12	A2F0S	İki antenli siyalilasyona uğramış fukozlanmamış glikanlar
GG13	A2FS	İki antenli siyalilasyona uğramış fukozlanmış glikanlar
GG14	TaGal	Agalaktozillenmiş iki antenli glikanlar
GG15	A2F0G	İki antenli galaktozillenmiş fukozlanmamış glikanlar
GG16	A2FG	İki antenli galaktozillenmiş fukozlanmış glikanlar
GG17	A2GS	İki antenli galaktozlarından siyalilasyonlanmış glikanlar
GG18	A2G	Galaktozillenmiş iki antenli glikanlar

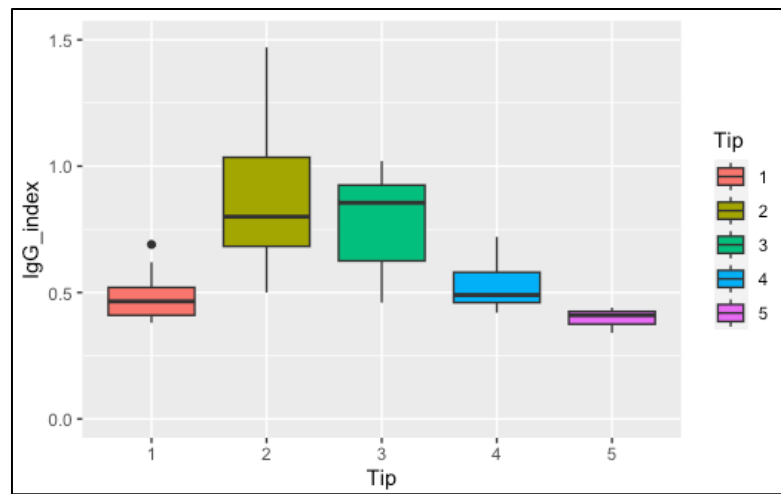
4.2 İstatistik Analiz Sonuçları

Verilerin analizinde öncelikle 5 farklı OKB tipinde anlam ifade eden glikanlar ve glikan gruplarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Verilere önce Shapiro-Wilk testi uygulanarak normal dağılım gösteren glikanlar ve glikan grupları belirlendi (Ek 1.A ve Ek 1.D). Normal dağılım gösteren glikanlar ve glikan gruplarına Levene testi uygulanarak homojeniteleri kontrol edildi (Ek 1.B ve Ek 1.E). Analizler normal ve homojen dağılmış glikanlar ve glikan grupları üzerinden gerçekleştirildi.

4.2.1 Tüm band tiplerinin tek yönlü varyans analizi

Tüm OKB tiplerine öncelikle tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) uygulandı. ANOVA sonucunda $p < 0.01$ seviyesinde anlamlı sonuç veren 2 glikan (H3N5F1 ve H5N4F1) ve 3 glikan grubu (GG14, GG16 ve GG18) belirlendi (Tablo 5 ve Tablo 6) (Ek 1.C ve Ek 1.F).

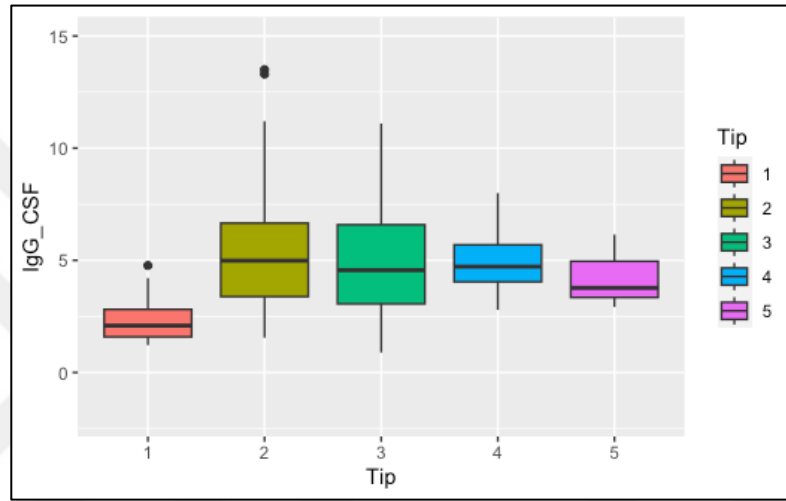
Anlamlı sonuç veren glikanlar ve glikan grupları hem kendi içlerinde hem de yaş, IgG indeksi, serum IgG konsantrasyonu, BOS IgG konsantrasyonu, BOS Albumin konsantrasyonu, serum Albumin konsantrasyonu gibi parametreler kullanılarak “Spearman” korelasyon analizi ile analiz edildi ve hastalıkla ilişkili olabilecek parametreler belirlendi (Şekil 41, Şekil 42 ve Şekil 43).



Şekil 26. OKB tiplerine göre IgG indekslerini gösteren kutu grafiği

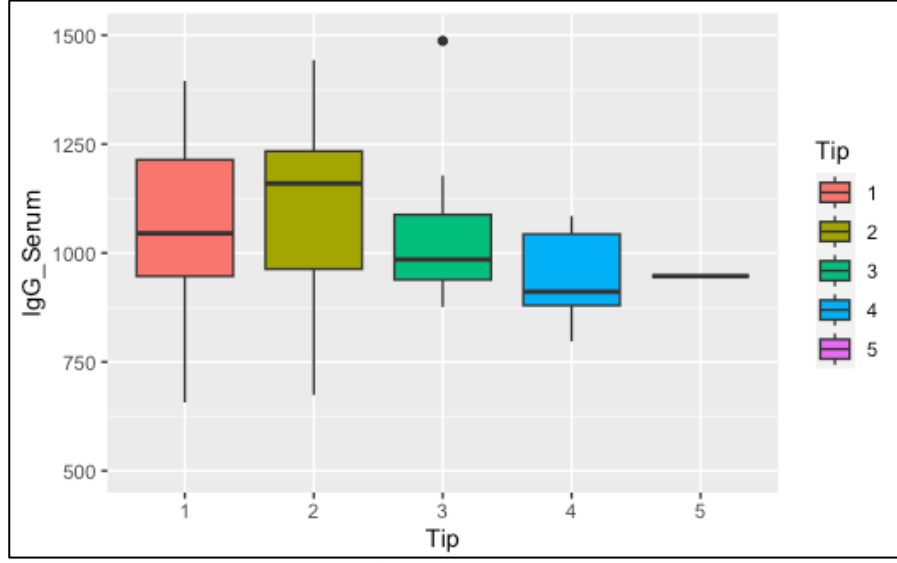
IgG indeksi Multipl Skleroz için belirleyici değerlerden biridir. Aşağıda verilen formüle dayanarak hesaplanır. Grafiğe göre literatürle tutarlı bir şekilde en yüksek IgG indeksi sonuçları MS ile ilişkilendirilen Tip 2 ve Tip 3'te görülürken en düşük miktar Tip 5'te görülmesi sayısının düşük olmasıyla ilişkilidir. Bu bilgi eşliğinde en düşük indeks sağlıklı olan Tip 1'de görülmektedir.

$$\text{IgG indeksi} = (\text{BOS IgG/Serum IgG}) / (\text{BOS albümin/Serum albümin})$$



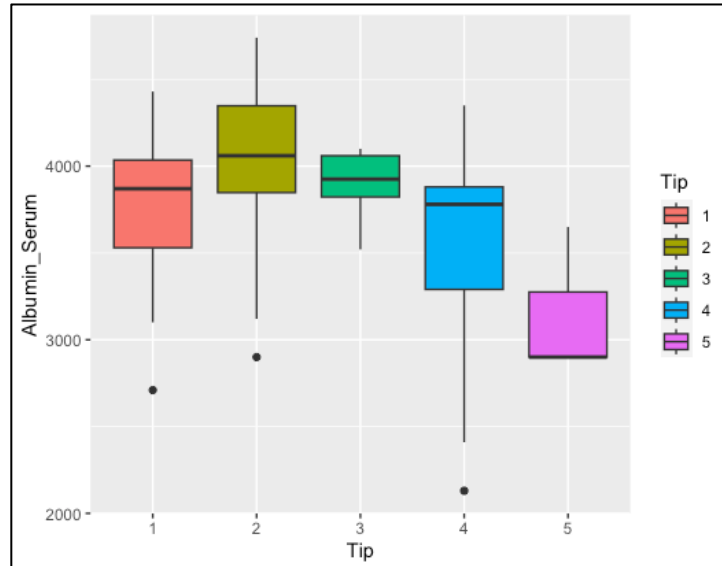
Şekil 27. OKB tiplerine göre beyin omurilik sıvısı IgG miktarlarını gösteren kutu grafiği

Grafiğe göre beyin omurilik sıvısında en yüksek miktarda IgG MS ile ilişkilendirilen Tip 2 ve Tip 3'te en düşük miktarda ise sağlıklı olan Tip 1'de görülmektedir. Sinir hücrelerine saldıran otoantikorlar beyin omurilik sıvısına geçtiği için beklenildiği gibi herhangi bir nörolojik hastalıkla ilişkilendirilmeyen Tip 1 örneklerinde BOS IgG miktarı düşük görülürken diğer gruplarda bu oran yüksektir ve yine en yüksek miktarda MS ile ilişkili OKB örneklerindedir.

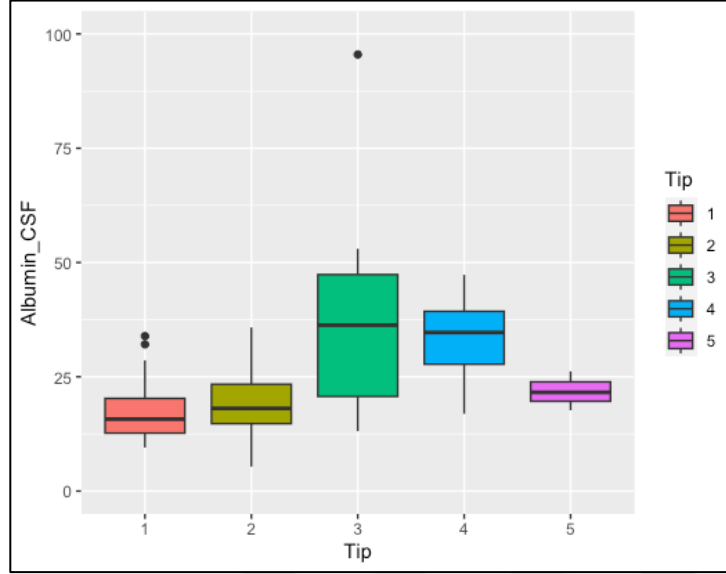


Şekil 28. OKB tiplerine göre serum IgG miktarlarını gösteren kutu grafiği

Grafiğe göre serumda en yüksek IgG miktarı MS ile ilişkilendirilen Tip 2’de görülmektedir. Multipl skleroz hastalarında serum IgG miktarının yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Tip 3, Tip 4 ve Tip 5 örneklerinde kontrol olan Tip 1’e göre daha düşük miktarda olmasının sebebi Tip 1 örneklerinin 3,4 ve 5’ten çok daha fazla olmasıdır.



Şekil 29. OKB tiplerine göre serum Albumin miktarlarını gösteren kutu grafiği



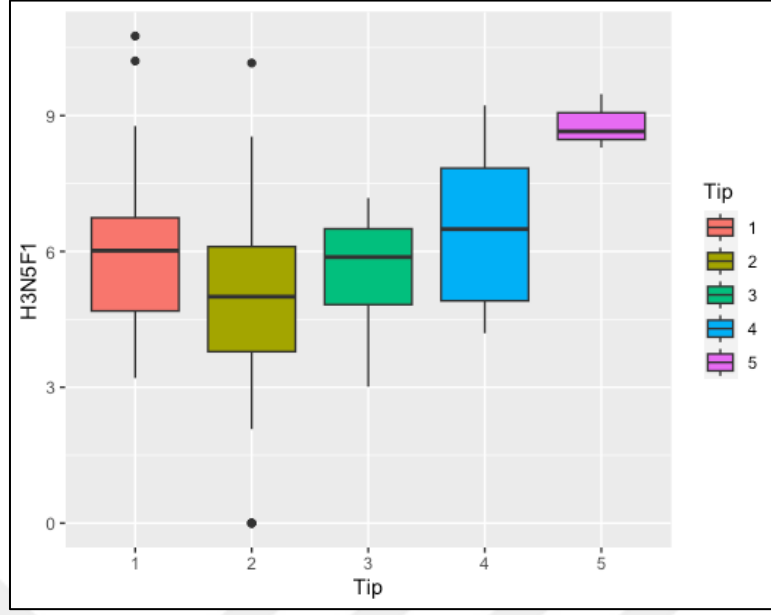
Şekil 30. OKB tiplerine göre beyin omurilik sıvısı Albumin miktarlarını gösteren kutu grafiği

Tablo 5. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren glikanlara ait değerler

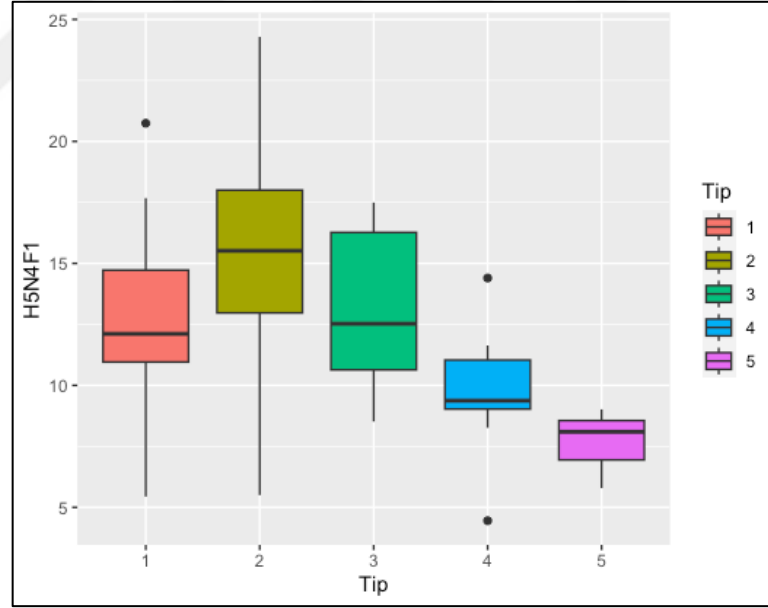
Glikan	Tip	1	Tip	2	Tip	3	Tip	4	Tip	5	p
İsmi	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	değeri
H3N5F1	6.074	4.750	5.601	6.534	8.807	<0.01					
H5N4F1	12.428	15.144	13.169	9.773	7.637	<0.01					

Tablo 6. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren glikan gruplarına ait bilgiler

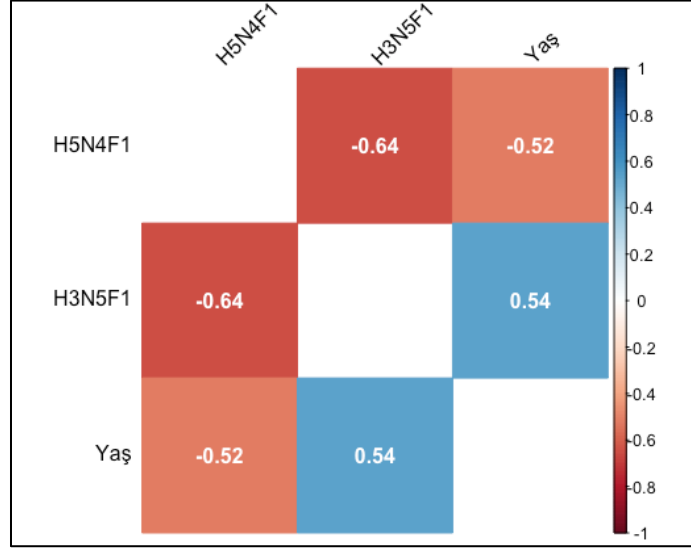
Glikan	Tip	1	Tip	2	Tip	3	Tip	4	Tip	5	p
Grubu	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama	değeri
GG14	0.2477	0.2315	0.2425	0.3088	0.4233	<0.01					
GG16	0.5352	0.5493	0.5487	0.4788	0.3766	<0.01					
GG18	0.5572	0.5719	0.5662	0.5022	0.3900	<0.01					



Şekil 31. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı farklılık gösteren H3N5F1 isimli glikana ait kutu grafiği

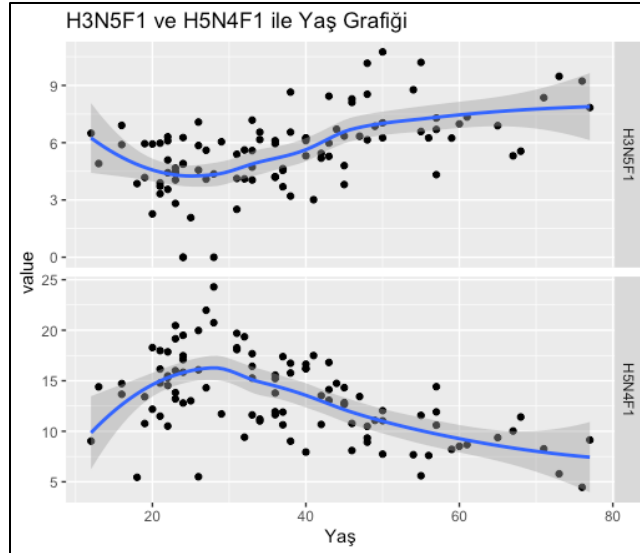


Şekil 32. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı farklılık gösteren H5N4F1 isimli glikana ait kutu grafiği

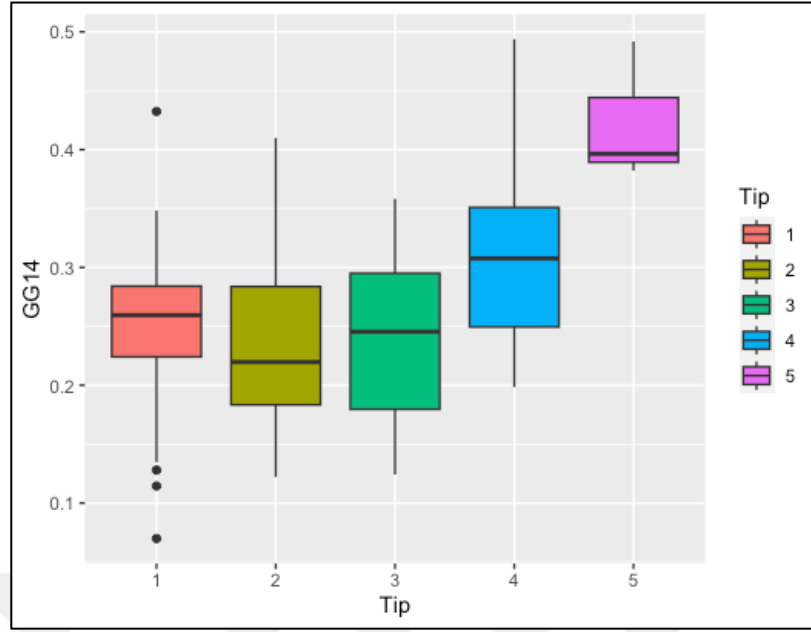


Şekil 33. Anlamlı sonuç gösteren glikanların, hastaların yaşlarıyla olan ilişkisini analiz eden korelasyon testine ait ısı haritası

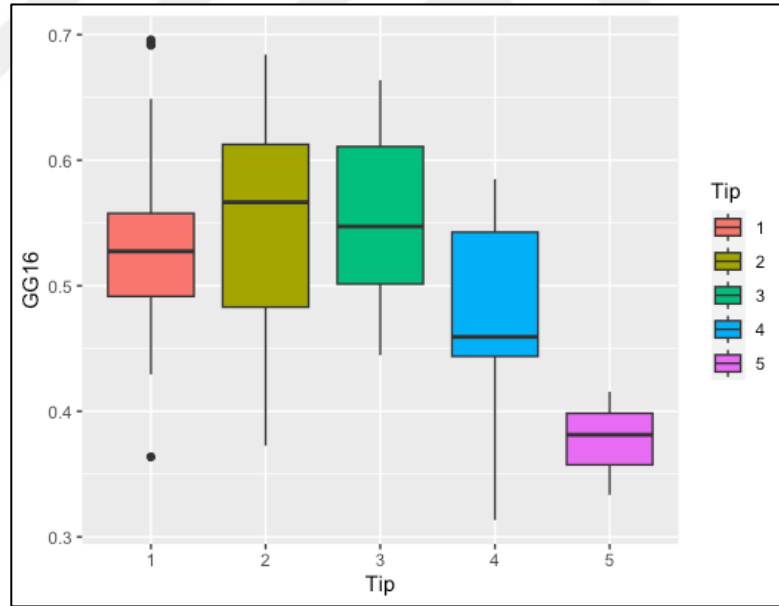
Korelasyon değerleri negatif ilişki değeri -1'den, pozitif ilişki değeri +1'e doğru sıralanmıştır. H5N4F1 isimli glikanın hastaların yaşlarıyla negatif bir korelasyona ait olduğu ve H3N5F1 isimli glikanın hastaların yaşlarıyla pozitif bir ilişkiye sahip olduğu görülmektedir.



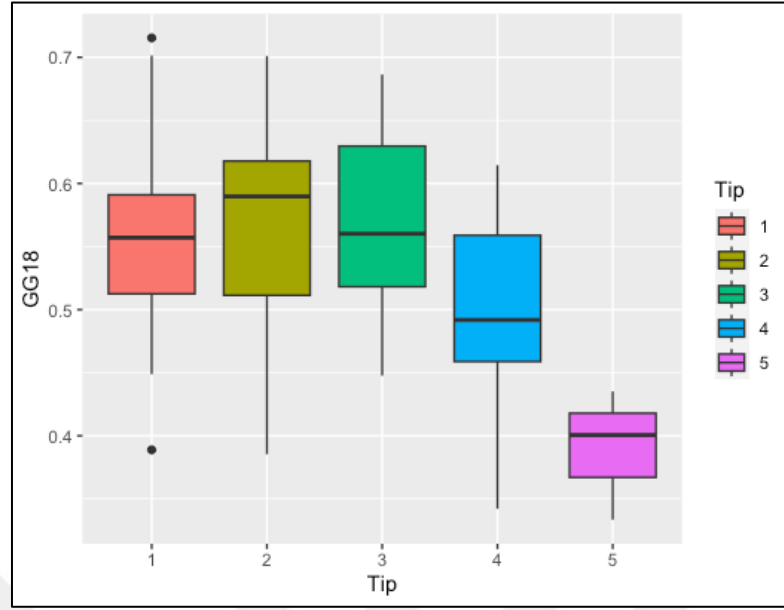
Şekil 34. H3N5F1 ve H5N4F1 isimli glikanların yaş ile ilişkisini gösteren nokta grafiği



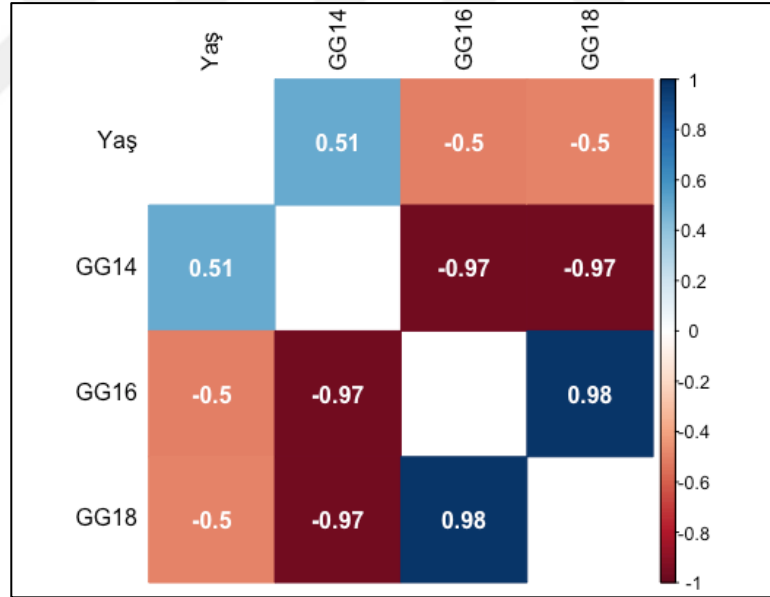
Şekil 35. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren GG14 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği.



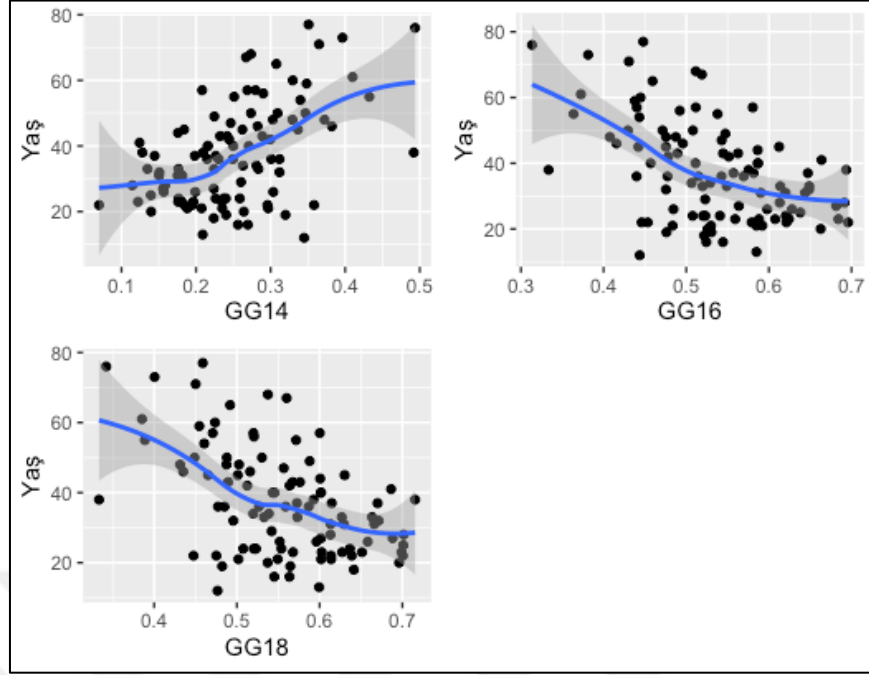
Şekil 36. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren GG16 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği



Şekil 37. Tek yönlü varyans nalizi (One-Way ANOVA) sonucu anlamlı sonuç veren GG18 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği

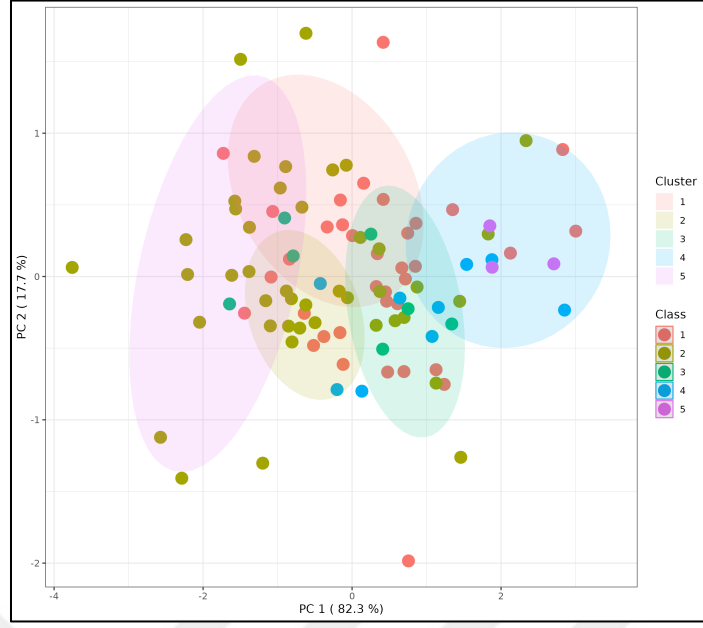


Şekil 38. Anlamlı sonuç veren glikan gruplarının, hastaların yaşlarıyla olan ilişkisini analiz eden korelasyon testine ait ısı haritası

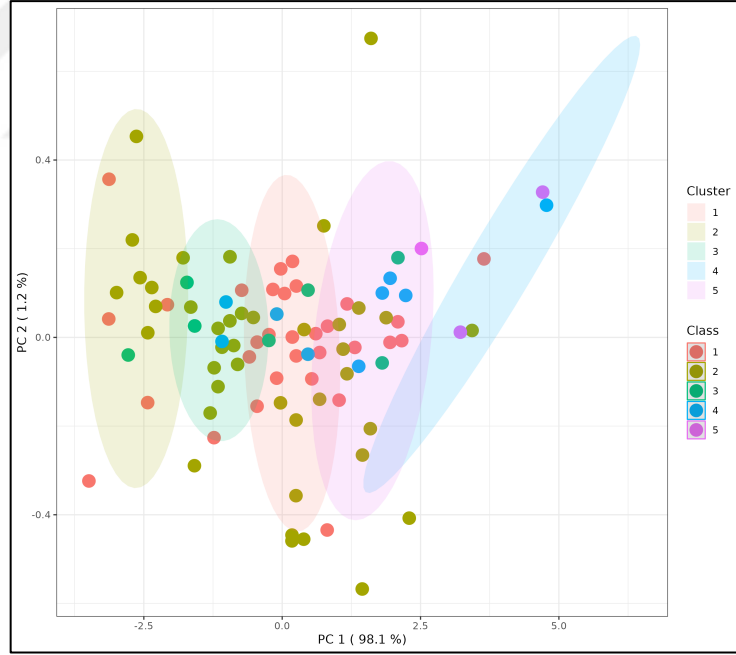


Şekil 39. Tüm glikan gruplarının yaş ile ilişkisini gösteren nokta grafiği

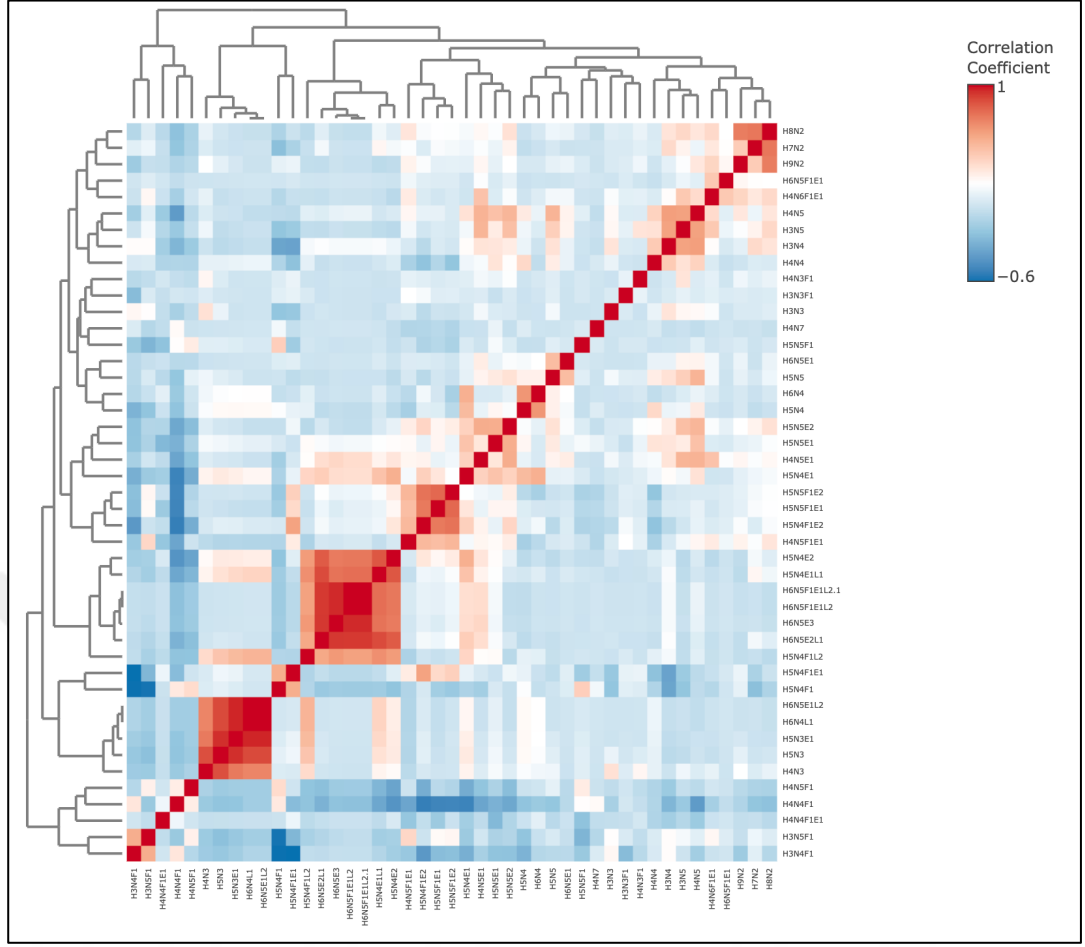
Grafikte görüldüğü üzere GG14 (Agalaktozillenmiş Glikan) isimli glikan grubu yaşın artışıyla birlikte artış göstermektedir. GG16 (Galaktozillenmiş) ve Fukozlanmış Glikan) isimli ve GG18 (Galaktozillenmiş Glikanlar) isimli glikan grupları ise yaş ile negatif bir korelasyon göstererek yaş arttıkça azalmaktadır.



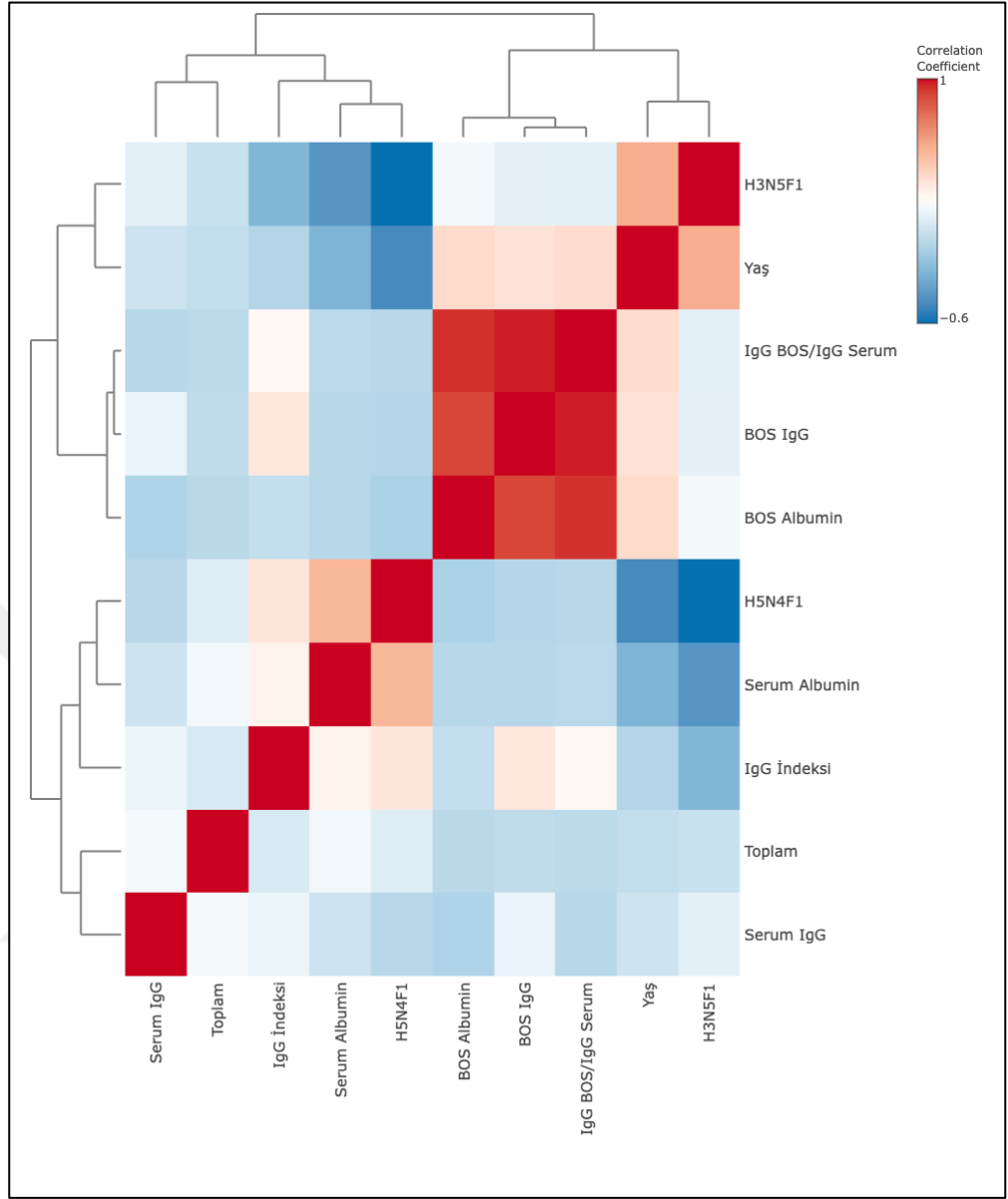
Şekil 40. Tüm OKB gruplarında anlamlı farklılık gösteren glikanlar ile yapılan PCA analizi ve küme grafiği



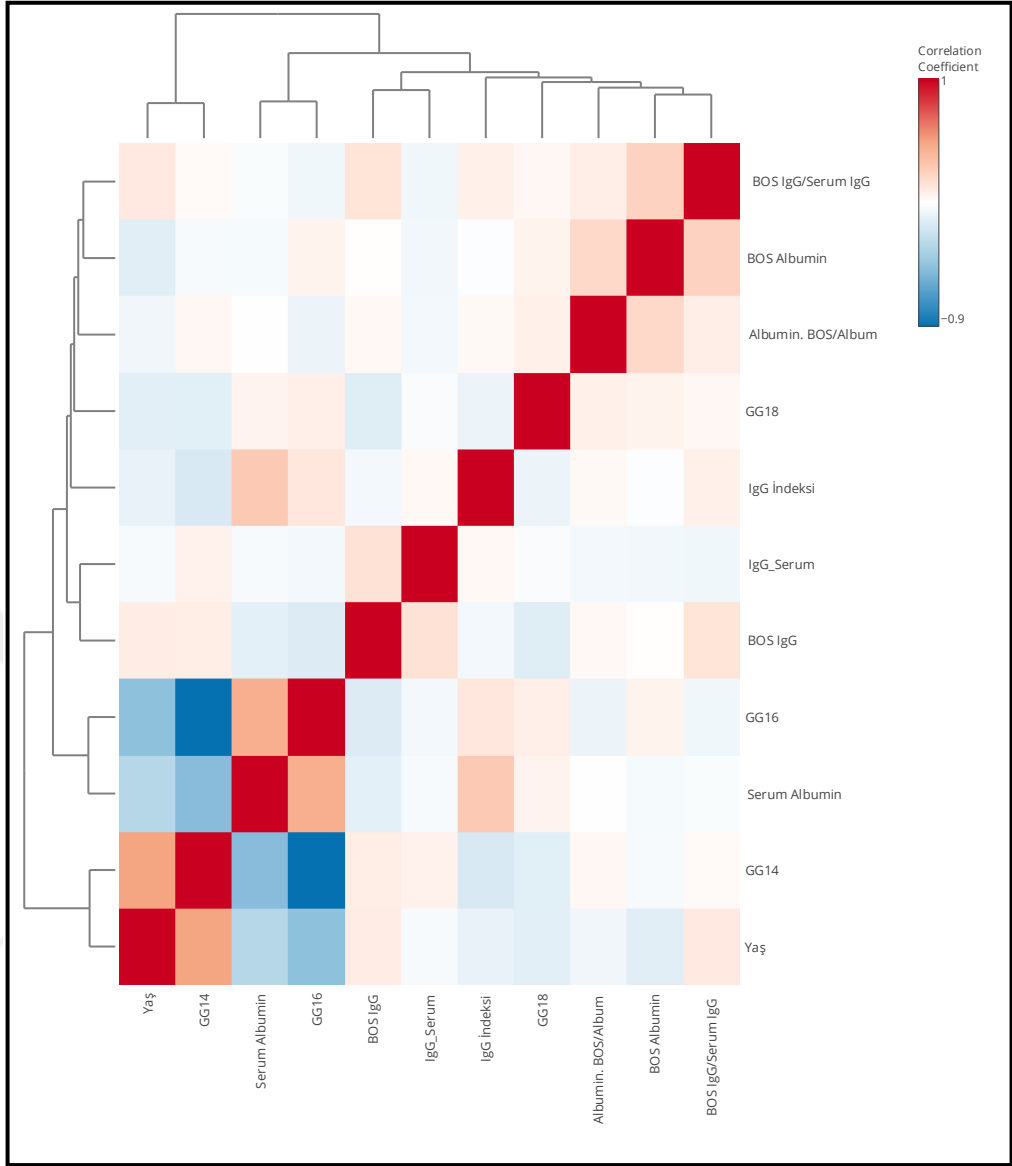
Şekil 41. Tüm OKB gruplarında anlamlı farklılık gösteren glikan grupları ile yapılan PCA analizi ve küme grafiği



Şekil 42. Tüm glikanların birbiriyle korelasyon ilişkisini gösteren “Spearman” korelasyon analizi ısı haritası



Şekil 43. Glikanlar ve hastalara ait serum IgG miktarı, BOS IgG miktarı, IgG indeksi verileriyle yapılmış “Spearman” korelasyon analizine ait ısı haritası



Şekil 44. Glikan grupları ve hastalara ait serum IgG miktarı, BOS IgG miktarı, IgG indeksi verileriyle yapılmış “Spearman” korelasyon analizine ait ısı haritası

4.2.2 Hastalık durumuna göre birleştirilmiş örneklerle yapılan analizler

ANOVA analizi sonrası OKB grupları MS tanısına bağlı olarak birleştirildi. Sağlıklı olarak tanımlanan Tip 1 Kontrol, MS tanısında kullanılan Tip 2 ve Tip 3 Hasta, diğer nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilen Tip 4 ve Tip 5 Diğer Hastalık olarak birleştirildi. Birleştirilmiş örneklerle tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) yapıldı. ANOVA sonucunda $p < 0.01$ seviyesinde anlamlı sonuç veren 2 glikan (H3N5F1 ve H5N4F1) ve 3 glikan grubu (GG14, GG16 ve GG18), $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı sonuç veren 1 glikan (H3N4F1) ve 1 glikan grubu (GG8) belirlendi

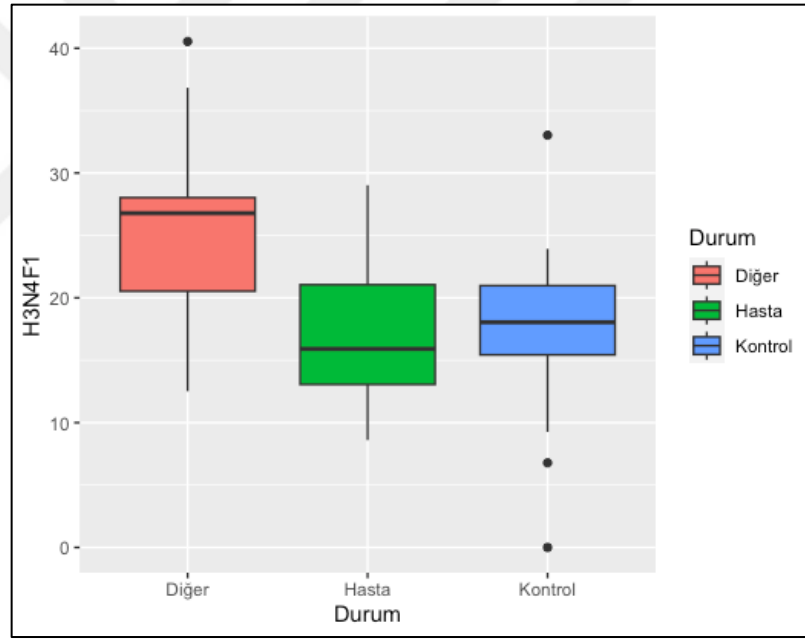
Örnekler hasta, sağlıklı ve diğer hastalık olarak sınıflandırıldıktan sonra anlamlı sonuç veren glikanlar Hasta-Sağlıklı, Sağlıklı-Diğer Hastalık şeklindeki gruplamalarla ROC (Alıcı işletim Karakteristiği) analizi ve AUC grafiği çizilerek duyarlılık ve spesifikliğı belirlenerek biyobelirteç olarak kullanılabilme durumları belirlendi.

Tablo 7. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş anlamlı sonuç veren glikanlara ait ortalama değerleri ve ANOVA p değerlerini gösteren tablo

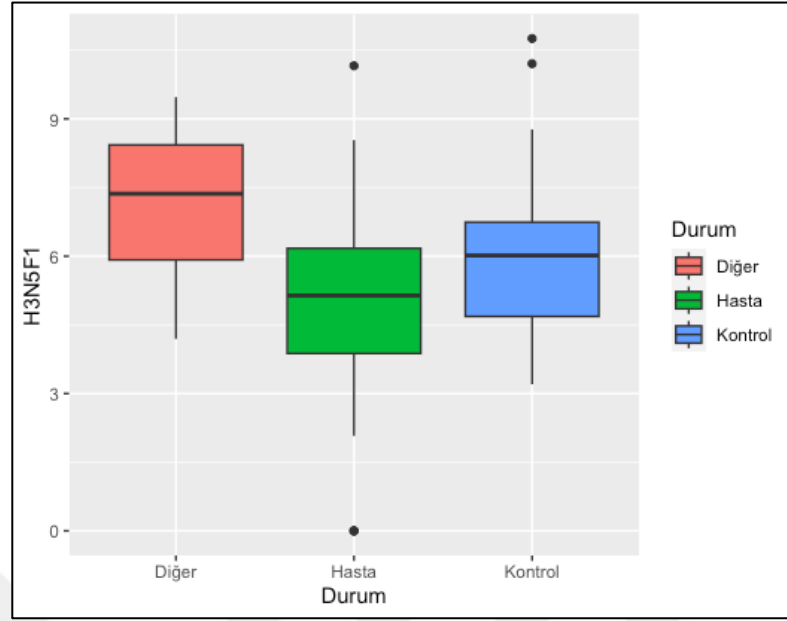
Glikan İsmi	Kontrol Ortalama Değer	Hasta Ortalama Değer	Diğer Ortalama Değer	p değeri
H3N4F1	17.6797	17.6231	25.4117	<0.05
H3N5F1	6.0744	4.8813	7.1025	<0.01
H5N4F1	12.4281	14.8398	9.2392	<0.01

Tablo 8. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş anlamlı sonuç veren glikan gruplarına ait ortalama değerleri ve ANOVA p değerlerini gösteren tablo

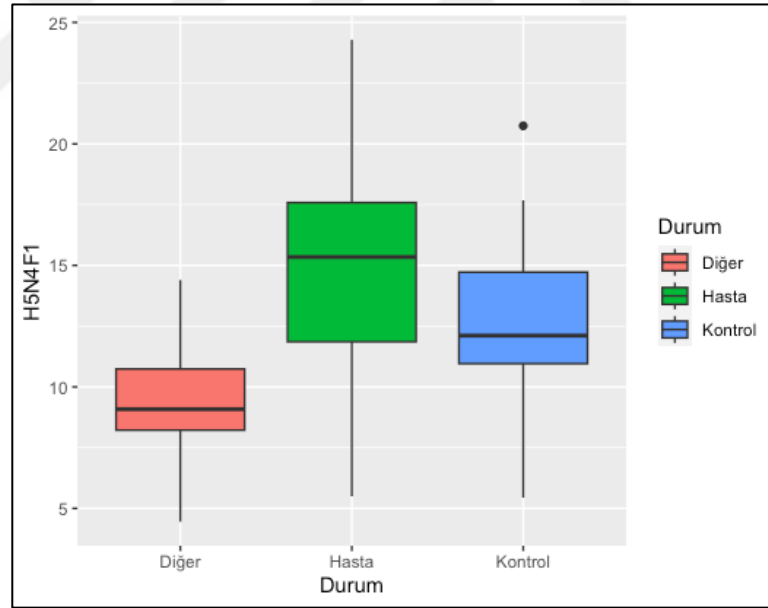
Glikan Grubu	Kontrol Ortalama Değer	Hasta Ortalama Değer	Diğer Ortalama Değer	p değeri
GG8	0.21556	0.19154	0.21500	<0.05
GG14	0.24778	0.23327	0.33750	<0.01
GG16	0.5352	0.5492	0.4533	<0.01
GG18	0.5572	0.5707	0.4717	<0.01



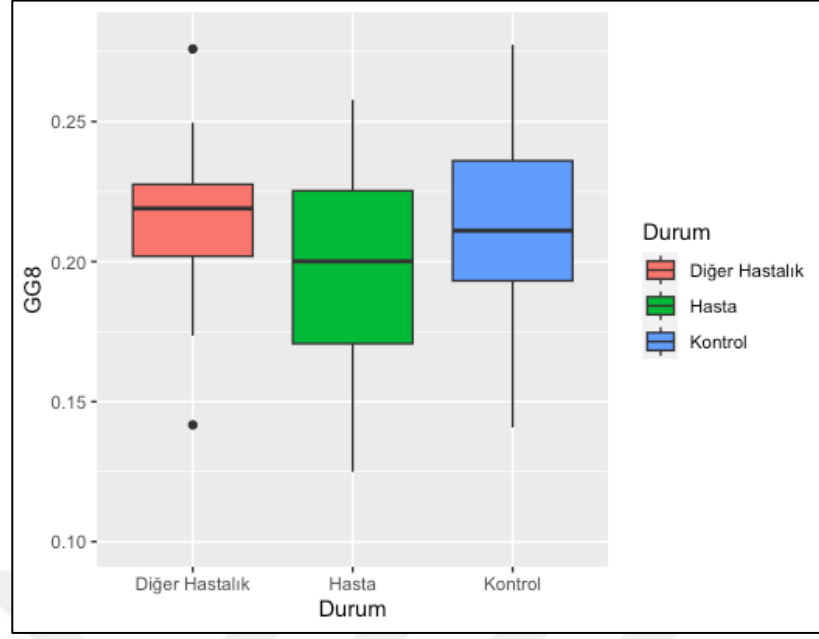
Şekil 45. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren H3N4F1 isimli glikana ait kutu grafiği



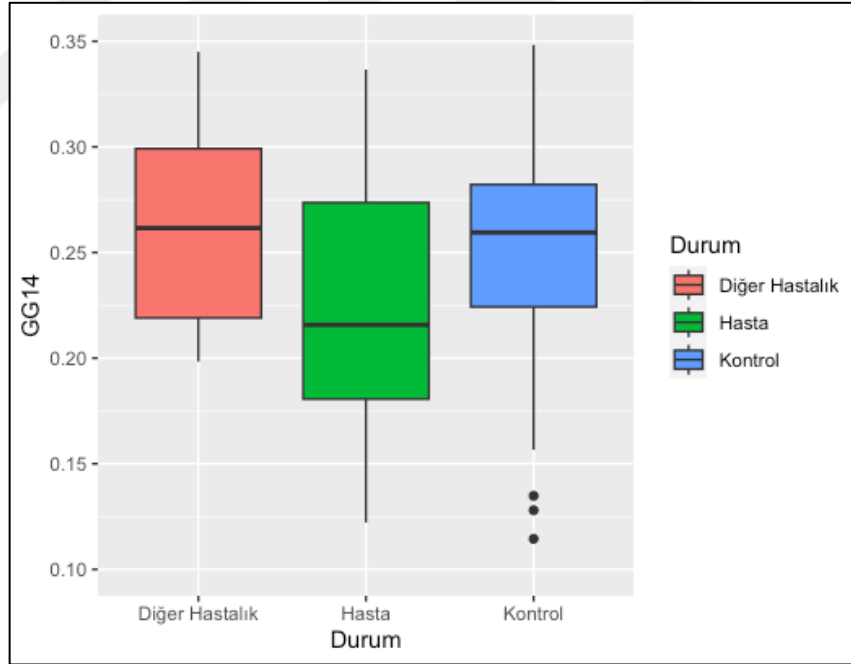
Şekil 46. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren H3N5F1 isimli glikana ait kutu grafiği



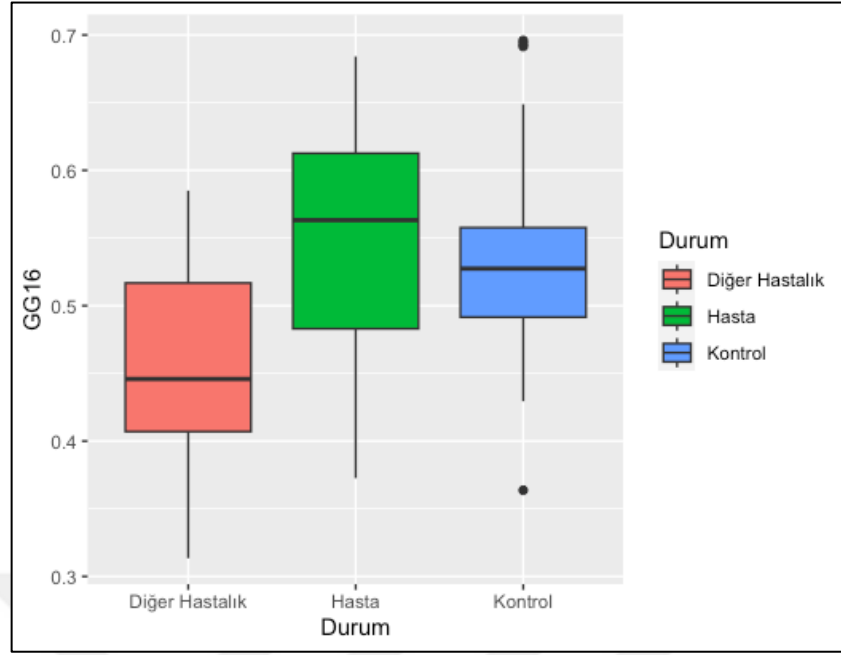
Şekil 47. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren H5N4F1 isimli glikana ait kutu grafiği



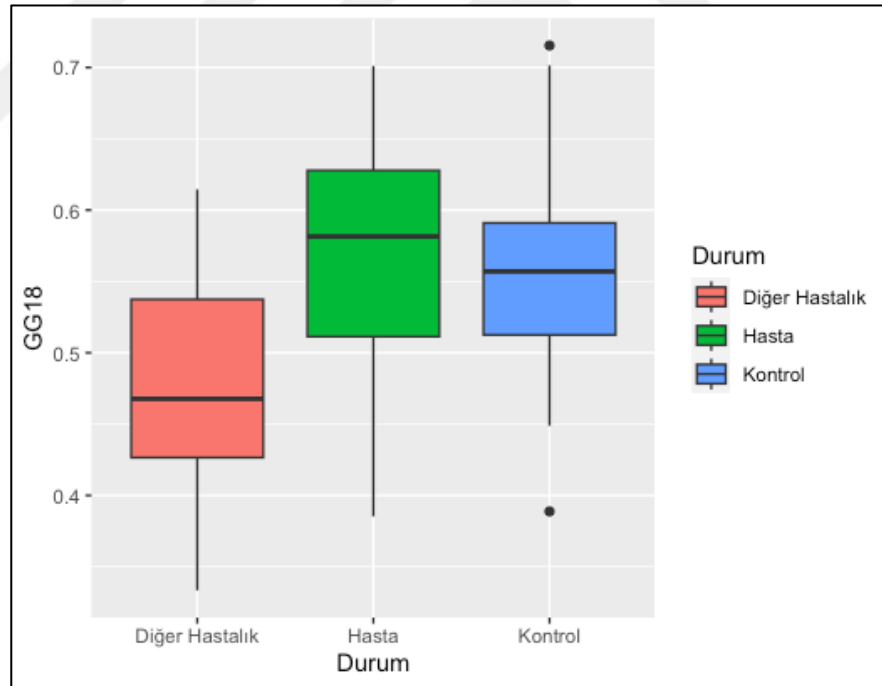
Şekil 48. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren GG8 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği



Şekil 49. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren GG14 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği



Şekil 50. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren GG16 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği



Şekil 51. Hastalık durumuna göre birleştirilmiş ve anlamlı farklılık gösteren GG18 isimli glikan grubuna ait kutu grafiği

ROC (Alıcı İşletim Karakteristiği) analizi sıklıkla belirlenen parametrelerin biyobelirteç olarak tahmin yeteneğinin belirlemek amacıyla kullanılır. Analizde başarı ölçütü olarak eğrinin altında kalan alan (AUC) değerleri kullanılmaktadır. Bu değerler kendi içlerinde ayrılarak başarı ölçütü belirlenir.

Tablo 9. AUC değerlerinin yorumlanması

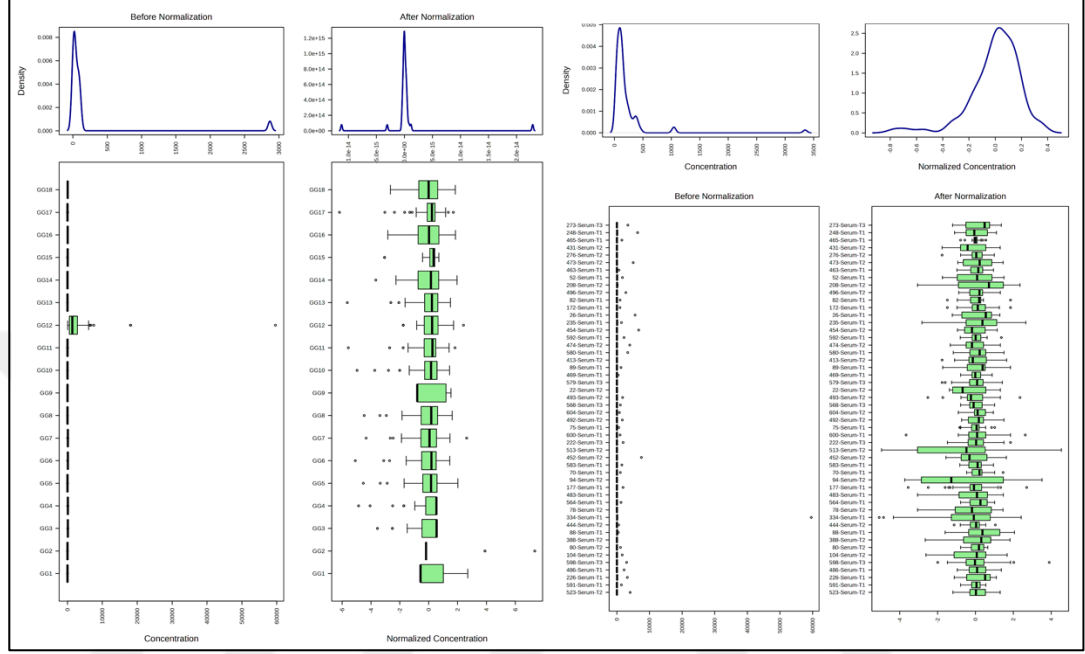
AUC=0,5	Tanı testi ayırım gücüne sahip değildir
$0,5 < \text{AUC} < 0,7$	Tanı testi “zayıf” bir ayırım gücüne sahiptir.
$0,7 < \text{AUC} < 0,8$	Tanı testi “kabul edilebilir” bir ayırım gücüne sahiptir.
$0,8 < \text{AUC} < 0,9$	Tanı testi “mükemmel” bir ayırım gücüne sahiptir.
$0,9 \leq \text{AUC}$	Tanı testi “olağanüstü” bir ayırım gücüne sahiptir

Classification method: **PLS-DA**

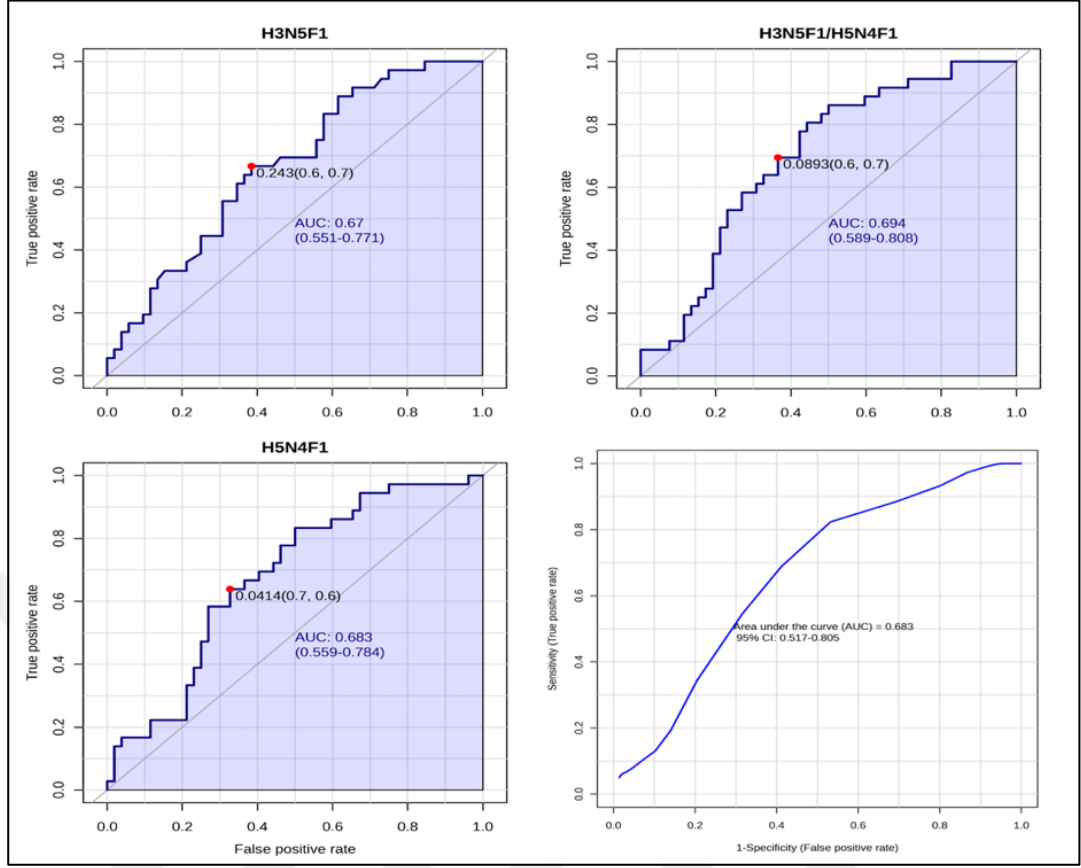
Feature ranking method: **PLSDA built-in**

Best model (max AUC): **Model 5**

Şekil 52. ROC analizinde kullanılan parametre ayarları

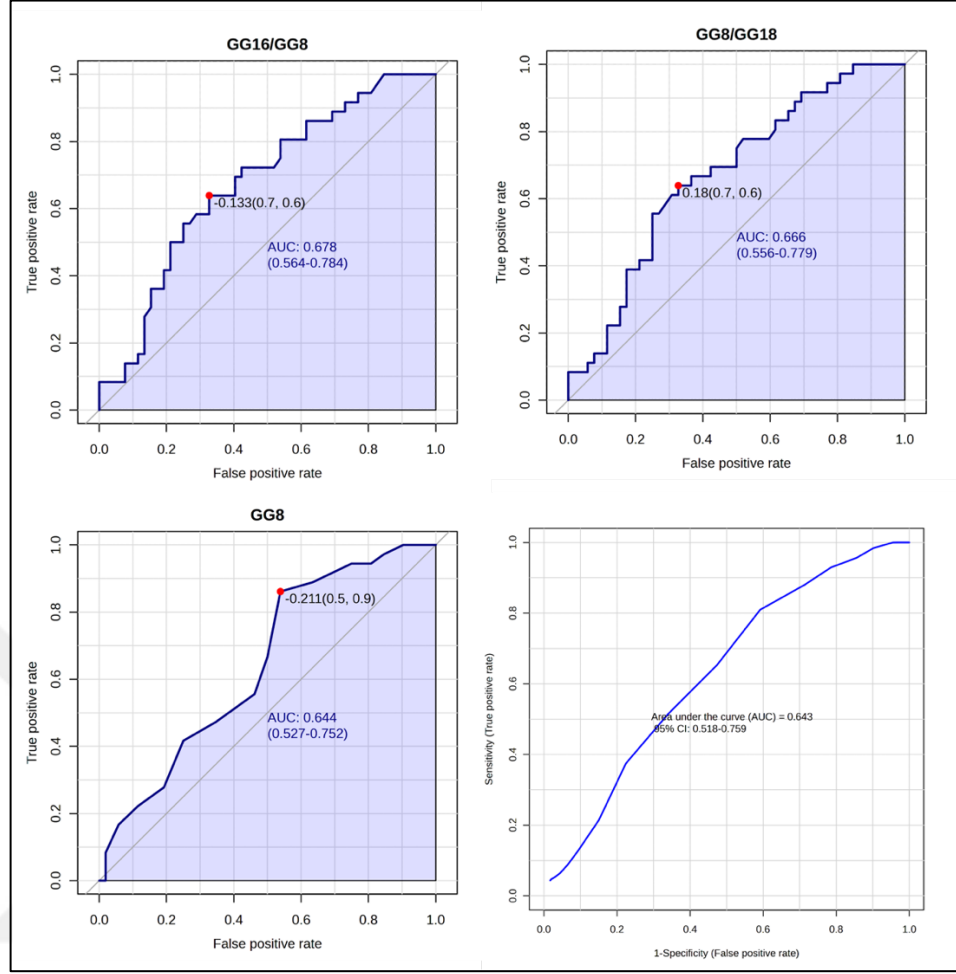


Şekil 53. ROC analizi için örneklerin normalizasyon öncesi ve sonrası görüntüler



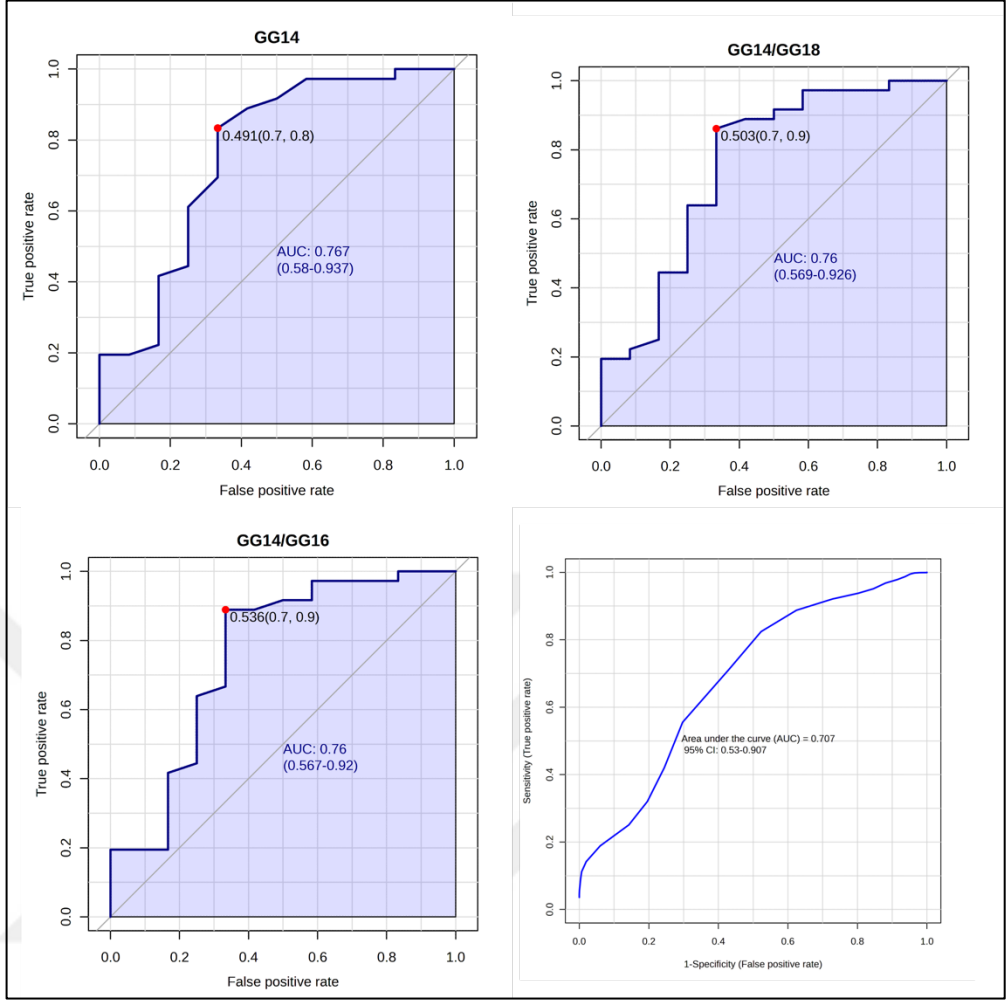
Şekil 54. Hasta-Sağlıklı örneklere ait anlamlı sonuç gösteren glikanlarla yapılmış ROC analiz sonuçları

Hasta örnekleri ve sağlıklı örnekler karşılaştırıldığında ayırım gücüne sahip olduğu belirlenen tüm parametrelerin zayıf ayırım gücü aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak glikan gruplarının sağlıklı örneklerden MS örneklerini ayırabilmek için kabul edilebilir aralığa yakın bir güce sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 55. Hasta-Sağlıklı örneklere ait anlamlı sonuç gösteren glikan gruplarıyla yapılmış ROC analiz sonuçları

Hasta örnekleri ve sağlıklı örnekler karşılaştırıldığında ayırım gücüne sahip olduğu belirlenen tüm parametrelerin zayıf ayırım gücü aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak glikan gruplarının sağlıklı örneklerden MS örneklerini ayırabilmek için zayıf bir güce sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 56. Diğer hastalık-Sağlıklı örnekler için anlamlı sonuç gösteren glikan gruplarıyla yapılmış ROC analiz sonuçları

Diğer hasta (Tip 4 ve Tip 5) örnekleri ve sağlıklı örnekler karşılaştırıldığında ayırım gücüne sahip olduğu belirlenen tüm parametrelerin kabul edilebilir ayırım gücü aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak glikan gruplarının sağlıklı örneklerden diğer hastalık örneklerini ayırabilmek kabul edilebilir güce sahip olduğu belirlenmiştir.

5 TARTIŞMA

5.1 N-Glikanların MALDI-TOF Analiz Sonuçları

Hastalıkların moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve biyobelirteçlerin belirlenebilmesi için uzun yıllardır farklı yaklaşımlarla veriler elde edilmektedir. Bunlardan en sık başvurulananlar ise omiks teknolojileridir. Omiks teknolojileri kullanılarak proteinlerden (proteomiks), lipidlerden (lipidomiks), genlerden (genomiks), RNA'dan (transkriptomiks) ve glikanlardan (glikomiks) elde edilen verilerle hastalıklar aydınlatılmaya çalışılmaktadır (152). Son 30 yıllık süreçte analitik tekniklerin gelişimiyle birlikte glikan çalışmaları hız kazanmış ve birçok farklı hastalığın mekanizmalarını anlamak için kullanılmaktadır (108). Glikozillenmenin protein katlanması, hücresel tanıma, hücresel hareketler ve immünolojik süreçlerde önemli etkilerinin keşfedilmesi ve sabit bir kalıba sahip olmayıp hücresel ortam koşullarının değişimiyle farklılaşmalarıyla glikozillenme motiflerinin değişmesi sayesinde bu motiflerin takibi ve belirlenmesi hem hasta-sağlıklı ayrımı için hem de hastalığın mekanizmasını belirleyebilmek için iyi bir aday yapmaktadır (112).

Multipl skleroz hastalığı mekanizması aydınlatılamamış bir nörodejeneratif hastalık olması, kesin bir belirtecinin belirlenememiş olması ve yoğunlukla gençleri etkilemesi sebebiyle farklı disiplinler farklı teknikler kullanarak hastalığı açıklamaya çalışmaktadır (13,15,153). Bu yaklaşımlardan biri de glikomikstir. Bu tez çalışmasında da MALDI-TOF sistemine dayalı glikomiks yaklaşımıyla bir perspektiften hastalık aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu amaçla öncelikle serum ve beyin omurilik sıvısı örnekleri oligoklonal band tiplerine göre sınıflandırılmıştır. Band sonuçlarından Tip 2 ve Tip 3 MS kabul edilip Tip 1 kontrol olarak alınmıştır. Tip 4 ve Tip 5 ise Nöromiyelit Optika, Devic hastalığı gibi diğer hastalıklar olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 3). Sınıflandırıldıktan sonra tüm serum ve BOS örneklerinden spin kolonlarla immuglobulin G izole edilmiştir (Şekil 14-15). İzolasyon sonrası serum ve BOS'tan izole edilmiş antikor örnekleri öncelikle 0.2, 0.5 ve 1 µL PNGase F enzimi ile gece boyu 37°C'de inkübe edilerek enzimatik aktivitenin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Enzim için optimize

miktarın 1 µL olduğu belirlendikten sonra tüm çalışmalar buna göre sürdürülmüştür (Şekil 22). PNGase F ile glikanlardan koparıldıktan sonra örneklerin analiz için türevlendirilmesi basamağına geçilmiştir.

Glikanları oluşturan monosakkaritler yapısal olarak farklı bağ açılarıyla birbirlerine bağlanırlar. Bu monosakkarit gruplarından biri olan siyalik asitler MALDI-TOF sistemiyle analiz edildiklerinde MALDI lazerinin etkileşimiyle destabilize olurlar ve sonuçlarda görülemeyebilirler. Bunu engellemek ve negatif iyonlaşan bu siyalik asitler pozitif iyon modunda daha iyi bir şekilde iyonlaştırarak çalışabilmek için çeşitli kimyasallarla türevlendirilirler. Bunlardan en sık kullanılanı etil esterifikasyondur. Bu yöntem a2,3- ve a2,6- bağlı siyalik asitleri stabilize hale getirir. Koparılmış glikanlar metanol içerisinde EDC/HOBt çözeltisinde 1 saat 37 °C’de etil esterifikasyon reaksiyonu ile türevlendirildi (Şekil 20). Türevlendirme sürecinden sonra serbest kalmış glikanlar ortamdaki enzim ve antikorlardan uzaklaştırılmak için pamuk ve mikropipet ucundan oluşturulan kolonlar yardımıyla zenginleştirildi. Beyin omurilik sıvısından izole edilen antikor miktarının düşük olmasına bağlı olarak glikan analizleri gerçekleştirilmeye çalışıldığında sonuç elde edilememiştir (Şekil 24). Bu sebeple çalışmaya sadece serumdan izole edilen antikorlarla devam edilmiştir. Glikanların hidrofilik yapıları sayesinde su ile ıslatılan pamuklar glikanların bağlanmak isteyeceği doğal afinite kolonları haline gelmektedir. Glikanlar kolonlara bağlandıktan sonra asetonitril ile pamuk kolonları yıkanmış ve bağlanmış olabilecek proteinler ve diğer maddeler uzaklaştırılmış, ardından tekrar su ile pamuk kolonlar al-ver yapılarak ıslatılmış ve glikanlar izole edilmiştir (Şekil 17). İzole edilen glikanlar SDHB matrisi ile karıştırılarak MALDI çelik plaka üzerine spotlanmıştır. Spotlama sonrası 1000-3500 m/z aralığını tarayacak şekilde ayarlanarak MALDI analizi yapılmıştır (Şekil 23). İzole edilen esterifiye edilmiş glikanların saklama sürelerini belirleyebilmek için glikanlar -20 °C’de saklanmış ve birer hafta aralıklarla analiz edilmiştir. Bunun sonucunda glikanların -20°’de 7 gün saklandıklarında bozulmaya başladığı, 14 gün sonunda ise analizden sonuç elde edilemediği görülmüştür (Şekil 25). Bu sebeple yapılan tüm analizler glikanların esterifiye edildiği gün gerçekleştirilmiştir. Analizlerden elde edilen m/z ve yoğunluk verileri sayısal veri haline dönüştürülmüştür. Bu veriler kullanılarak tüm glikanlar için

bağıl bolluk hesaplamaları yapılmış ve bu veriler kullanılarak glikanlar kimyasal yapı benzerliklerine dayanarak 18 farklı gruba sınıflandırılmıştır. Bütün analizler bu hesaplamalar üzerinden sürdürülmüştür (Tablo 4).

5.2 İstatistik Analiz Sonuçları

5.2.1 Tüm band tiplerinin tek yönlü varyans analizi

Oligoklonal band sonuçlarının 5 farklı sonuç vermesi sebebiyle tek yönlü varyans (One-Way ANOVA) testi ile analiz edilme yoluna gidilmiştir. Önce örneklerle Shapiro-Wilk testi ve Levene testi uygulanarak dağılım yapıları analiz edilmiş ve homojen ve normal dağılım gösteren glikan ve glikan grupları seçilerek ANOVA analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda H3N5F1 ve H5N4F1 isimli 2 glikan ile GG14 (Agalaktozillenmiş), GG16 (İki antenli fukozlanmış) ve GG18 (Galaktozillenmiş) glikan gruplarında anlamlı sonuç görülmüştür (Tablo 5 ve 6). Bu glikanlar ve glikan gruplarıyla kutu grafiği oluşturulduğunda H3N5F1'in Tip 2 ve Tip 3 örneklerinde sağlıklı olarak Tip 1, Tip 4 ve Tip 5 örneklerine göre daha düşük seviyede olduğu görülürken (Şekil 31) H5N4F1'in Tip 2 ve Tip 3 örneklerinde daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 32). Glikan gruplarından ise GG14'ün Tip 2 ve Tip 3 örneklerinde diğer örneklerle göre daha düşük seviyede olduğu görülürken (Şekil 35) GG16 (Şekil 36) ve GG18'in (Şekil 37) Tip 2 ve Tip 3 örneklerinde daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür.

Anlamlı sonuç gösteren glikan ve glikan gruplarının yaş, serum IgG konsantrasyonu, BOS IgG konsantrasyonu, IgG İndeksi, serum albumin konsantrasyonu ve BOS IgG konsantrasyonlarını korelasyonunu analiz etmek için "Spearman" korelasyon testi uygulandı (Şekil 33-34-38-39-42-43-44). Analiz sonucunda H3N5F1 ile yaş arasında pozitif bir korelasyon belirlenirken H5N4F1 ile yaş arasında negatif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 34). Glikan gruplarında ise GG14'ün yaş artışıyla tüm örneklerde seviyesinin yükseldiği GG16 ve GG18'in ise tüm örneklerde azalma gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 39). Galaktozilasyon motifleri yaş ile farklı bir değişim gösterirler. İnsanlarda çocukluktan 25 yaşına kadar ki süreçte agalaktozile glikanlar %30 oranından %20 oranına düşüş

gösterirken 70 yaşında %40 oranına yükseliş gösterir (26). Bizim çalışmamızda da bu bilgilerle oldukça tutarlı şekilde agalaktozile glikanlar yaşla birlikte artış gösterirken galaktozillenmiş glikan motifleri yaş ile birlikte düşüş göstermektedir (Şekil 39).

5.2.2 Hastalık durumuna göre birleştirilmiş örneklerle yapılan analizler

Tüm band tipleriyle ayrı analizler yapıldıktan sonra band tipleri ilişkilerine bağlı olarak birleştirilmiştir. Tip 1 örnekleri tek bırakılarak sağlıklı/kontrol olarak sınıflandırılmış, Tip 2 ve Tip 3 örnekleri birleştirilerek MS olarak sınıflandırılmış, Tip 4 ve Tip 5 ise birleştirilerek diğer hastalık olarak sınıflandırılmıştır. Sınıflandırma sonrası örneklerle tekrar ANOVA uygulanmıştır. Analiz sonucunda önceki analizden farklı olarak H3N4F1 isimli glikanın ve önceki analizde de belirlenmiş H3N5F1 ve H5N4F1 isimli glikanların anlamlı sonuç verdiği görülmüştür (Tablo 7). Glikan gruplarına analiz uygulandığında da önceki analizden farklı olarak GG8 (Bisektik iki antenli) isimli glikan grubunun ve önceki analizde de anlamlı sonuç veren GG14 (Agalaktozillenmiş), GG16 (İki antenli fukozlanmış ve galaktozillenmiş) ve GG18 (Galaktozillenmiş) isimli grupların anlamlı sonuç gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 8). Bu glikanlar ve glikan gruplarıyla kutu grafiği oluşturulduğunda H3N4F1'in MS örneklerinde sağlıklı örnekler ve diğer hastalık örneklerine göre daha düşük seviyede olduğu görülürken (Şekil 45), H3N5F1'in MS örneklerinde sağlıklı ve diğer hastalık örneklerine göre daha düşük seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 46). H5N4F1'in ise MS örneklerinde diğer gruplara göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 47). Glikan gruplarından ise GG8 ve GG14'ün MS örneklerinde diğer örneklere göre daha düşük olduğu görülürken (Şekil 48 ve Şekil 49), GG16 (Şekil 50) ve GG18'in (Şekil 51) MS örneklerinde daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür.

Wuhrer ve arkadaşları (154) tarafından 27 MS hastası ve 21 kontrol ile yapılmış ve hastalar ve kontrollerden alınan serum ve beyin omurilik sıvılarından izole edilmiş IgG'lerin triptik kesimle fragmanlarına ayrıldıktan sonra MALDI-FTIR ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda MS hastalarının BOS'larından izole edilen IgG1'lerde bisektik glikanların ve fukozlanmış glikanların anlamlı bir sonuç vererek arttığını ve galaktozlanmış glikanların azaldığını göstermişlerdir. Bununla birlikte serum ve BOS glikanlarını kendi içlerinde karşılaştırdıklarında da galaktozillenmiş glikanların

kontrol örneklerinde de serumda BOS'a göre düşük miktarda olduğunu belirtmişlerdir. Bu görülen galaktozillenmenin azalması ve fukozlanmanın artmasının antikorların proinflamatuvar etkisini açıklayabileceğini ifade etmişlerdir.

Cvetko ve arkadaşları(155) tarafından Orkney adalarından 83 MS hastası ve 88 kontrol'den elde edilen serumlar ve serumlardan izole edilmiş IgG'ler ile yapılan ve HILIC-FLD tekniği kullanılan serbest glikan analizi çalışmasında MS hastalarının serumlarında yüksek çatallanmaya sahip (üçlü ve dördü galaktozillenmeye sahip) ve daha karmaşık glikan gruplarının (çoklu galaktoz ve siyalik asit gruplu glikanlar) artış gösterdiğini az çatallı glikanların (tek ve iki antenli glikanların) ise azalma gösterdiğini belirlemiştir. Spesifik olarak ise serum proteinlerinde 12 farklı glikanın IgG'de ise 5 farklı glikanın anlamlı sonuç gösterdiğini belirtmişlerdir. Bunlardan biri de H5N4F1'dir. En belirgin şekilde ise yüksek mannozlu glikanların MS hastalarının IgG'lerinde kontrole göre daha yüksek miktarda, çekirdekten fukozlanmış glikanların ise MS hastalarının IgG'lerinde kontrole göre daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte MS hastalarının IgG'lerinde gözlemlenmeler de serum glikomlarında trigalaktozillenmiş ve tetragalaktozillenmiş glikanların artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Multipl skleroz alt tiplerinde ise herhangi anlamlı bir ayırım sonucu elde edememişlerdir. İmmunoglobulinlerde çekirdekten bağlanmış glikanların antikora bağlı hücrel sitotoksite (ADCC) için bir kontrol butonu olarak görev aldığını ve bu fukozillenmenin düşük olduğu noktalarda antikorların ADCC'yi daha fazla tetiklediğini kendi çalışmalarında da bunun düşük olarak bulunmasının MS hastalarında proinflamatuvar etkinin artmasının sebebi olabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmalarında yüksek mannozlanmanın MS hastalarında ilk kez raporlandığını ve bu mannozlanmanın maltoz bağlama proteinleriyle etkileşerek kompleman sistemin tetiklenmesini ve bunun da MS hastalarında demiyelinizasyonu tetiklediğini düşündüklerini belirtmişlerdir. Elde ettikleri tüm glikan verileriyle oluşturdukları ROC eğrisi ile sonuçlarının IgG'lerde AUC=0.852 değeri ve serumda AUC=0.798 değeri ile glikanların biyobelirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Kennedy ve arkadaşlarının (156) 38 MS ve 40 kontrol'ün serum ve BOS'larından izole ettikleri IgG'ler ile yaptıkları Lektin Western Blot çalışmasında anlamlı şekilde MS hastalarında galaktozillenmiş glikanların serumda daha yüksek miktarda

olduğunu belirlemişler ve bunun galaktozilasyonun kompleman bağlı sitotoksite ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Turcic ve arkadaşlarının (128), 128 MS ve 83 kontrol ile yaptığı ve literatürde şimdiye kadar en yüksek örnek sayısı ile yapılmış çalışmada HILIC-FLD tekniği kullanılarak örneklerin serum ve BOS'larından izole edilmiş IgG'ler kullanılmıştır. Çalışma diğerlerinden farklı olarak kontrol grubunun diğer nörolojik hastalıklar ve demiyelinizasyon hastalıklarına sahip örnekleri içerdiğini ifade etmişler ve kontrol grubu içerisinde OKB sonuçları Tip 2, 3, 4 ve 5 olan örnekleri de kullanmışlardır. Bununla birlikte MS örneklerinin %93'ünde pozitif OKB sonucu görülürken kontrol örneklerinin %16'sında pozitif OKB sonucu olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada MS örneklerinin beyin omurilik sıvısından elde ettikleri IgG'lerde monogalaktozillenmiş glikanların ve bisektik glikanların arttığını ve fukozillenmiş glikanların azaldığını belirtmişlerdir. Serumdan elde ettikleri sonuçlarda ise MS ile kontrol arasında anlamlı bir sonuç bulamadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmalarında istatistiki olarak anlamlı fark oluşturmaya da kullandıkları grafikler üzerinde çeşitli glikan gruplarının hasta ve kontroldeki farkları belirtilmiştir. Bu grafiklere bağlı olarak MS hastalarının serum ve BOS'larında agalaktozillenmiş glikanlar kontrole göre daha az, monogalaktozillenmiş glikanlar BOS'da fazla yüksek iken serumda yakın bir noktada, digalaktozillenmiş glikanlar ise BOS'da düşüken serumda bir miktar daha yüksek olarak görülmüştür. Temelde antikor galaktozilasyonunun MS hastalarında artış olduğunu göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise çekirdekten fukozillenmiş bir glikanın (H3N4F1) MS örneklerinde kontrole yakın miktarda fakat diğer hastalık gruplarından daha düşük miktarda olduğu ve yine benzer şekilde fukozillenmiş ve bisektik sınıfında olan bir glikanın (H3N5F1) MS hastalarında kontrol ve diğer hastalık gruplarına göre düşüş gösterdiği belirlenirken fukozillenmiş ve digalaktozile bir glikanın (H5N4F1) kontrol ve diğer gruplara göre daha yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir.

Glikan gruplarında ise bisektik glikan grubunun (GG8) MS'de kontrole ve diğer hastalıklara göre daha düşük olduğu ve yine benzer şekilde agalaktozile glikan grubunun MS'de diğer gruplara göre daha düşük miktarda olduğu belirlenirken,

fukozlanmış ve iki antenli galaktozillenmiş glikan grubuyla (GG14), iki antenli galaktozillenmiş glikan grubunun artış gösterdiği belirlenmiştir.

Anlamli sonuç gösteren bu glikanlar ve glikan gruplarıyla Sağlıklı-MS,Sağlıklı-Diğer hastalık şeklinde gruplandırma yapılarak ROC analizi geręekleřtirildięinde glikan gruplarının Sağlıklı-MS grubunun 0.5-0.7 aralığında ayırabildiği Diğer hastalık-Sağlıklı grubunu ise 0.7-0.8 aralığında ayırabildiği belirlenmiştir.

Antikorlara bağlanan farklı glikan gruplarının antikorların diğer immün hücreleriyle etkileşimlerini kontrol ettiği ve immün yanıtın düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Bizim ęalıřmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre galaktozillenmiş glikanlar MS hastalarında daha yüksek miktarda görölmektedir. Yapılan ęalıřmalarda romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda galaktozillenmiş antikorların miktarının azalışının ve agalaktozillenmiş glikanların artışının gözlenmiş olması galaktozilasyonun proinflamatuvar etkiden ęok antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu düşündürmekteydi (157). Fakat yakın zamanlı ęalıřmalarda galaktozilasyonun artışının antikorların C1q isimli kompleman grubuna ilgisini arttırdığını ve bu artışında kompleman bağımlı sitotoksiteyi tetiklediğini (CDC) göstermiştir (158) . Bununla birlikte fukozlanmış ve galaktozillenmiş IgG'lerin fukozlanmış ve galaktozillenmemiş varyantlara göre FcγRIIIa reseptörüne ilgisini arttırdığını ve bunun antikor bağımlı hücrel sitotoksiteyi (ADCC) tetiklediğini ve yine benzer şekilde galaktozillenmiş antikorların FcγRIIa reseptörüne ilgisinin arttığını ve bunun da antikor bağımlı hücrel fagositozu tetiklediğini gösteren ęalıřmalar bulunmaktadır (ADCP) (159,160). Bisektik glikan gruplarının artışının da yine benzer şekilde antikorların FcγR'leriyle etkileşimini arttırarak ve ADCC'yi de bununla birlikte arttırdığı bilinmektedir. Bunun yanında proinflamatuvar bu etkiden bağımsız olarak progresif MS hastalarında bisektik glikanların azaldığı belirlenmiştir (25,26,161). Sonuğlarımızda da benzer şekilde bisektik glikan gruplarında azalma gözlemlemekteyiz. Fakat bu glikozilasyon motifinin gösterdiği değişimin etkilerini kesin olarak ağıklayamıyoruz.

6 SONUÇ

Literatürde bilindiği kadarıyla çalışmamız Multipl skleroz hastalarının serumundan izole edilmiş IgG'lerden elde edilen serbest glikanların MALDI-TOF sisteme dayalı olarak analiz edildiği ilk çalışmadır

Çalışmamızda 2 farklı glikanın ve 3 farklı glikan grubunun OKB sonuçlarına göre anlamlı sonuç verdiğini belirledik. Bunun yanında örneklerimizi MS hastalığı ve diğer hastalıklara göre birleştirdiğimizde 3 farklı glikanın ve 4 farklı glikan grubunun anlamlı sonuç verdiğini belirledik. Belirlenen glikanlar ve glikan grupları, antikor glikozillenmesinin MS hastalığında önemli bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Bu sonuçlarla birlikte örneklem sayısı arttırılarak ileri çalışmaların yapılmasıyla antikor glikozilasyonunun MS hastalığının mekanizmasını anlamamızda önemli bir yer kaplayacağını düşünmekteyiz.

7 KAYNAKLAR

1. Atkins G, Amor S, Fletcher J, Mills K. The Biology of Multiple Sclerosis [Internet]. Cambridge University Press; 2012 [cited 2024 Feb 24]. Available from: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511979088>
2. Wesley S, Hafler DA. Multiple sclerosis. In: The Autoimmune Diseases. Elsevier; 2019. p. 961–86.
3. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. Vol. 26, European Journal of Neurology. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 27–40.
4. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Vol. 15, Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group; 2015. p. 545–58.
5. Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of Multiple Sclerosis [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 24]. Available from: <https://www.atlasofms.org/map/turkey/epidemiology/number-of-people-with-ms>
6. Fairweather D. Autoimmune Disease: Mechanisms. In: Encyclopedia of Life Sciences. Wiley; 2007.
7. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. Vol. 278, Journal of Internal Medicine. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 369–95.
8. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the Blood-Brain Barrier in Multiple Sclerosis. Vol. 45, Archives of Medical Research. Elsevier Inc.; 2014. p. 687–97.
9. Wesley S, Hafler DA. Multiple sclerosis. In: The Autoimmune Diseases. Elsevier; 2019. p. 961–86.
10. Lewis PA, Spillane JE. Multiple Sclerosis. In: The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease. Elsevier; 2019. p. 221–51.
11. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Vol. 17, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2018. p. 162–73.
12. Kennedy PGE, George W, Yu X. The elusive nature of the oligoclonal bands in multiple sclerosis. Journal of Neurology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023.
13. Dobson R, Topping J, Davis A, Thompson E, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid and urinary biomarkers in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand. 2013 Nov;128(5):321–7.
14. Teunissen CE, Zetterberg H, editors. Cerebrospinal Fluid Biomarkers. Vol. 168. New York, NY: Springer US; 2021.
15. Konen FF, Hannich MJ, Schwenkenbecher P, Grothe M, Gag K, Jendretzky KF, et al. Diagnostic Cerebrospinal Fluid Biomarker in Early and Late Onset Multiple Sclerosis. Biomedicines. 2022 Jul 1;10(7).
16. Antibody Diversity. In: Immunology for Pharmacy [Internet]. Elsevier; 2012. p. 79–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323069472100100>
17. Beale D. Structure and function of immunoglobulins. Ann Ist Super Sanita. 1969;5(5):666–79.
18. Sun Y, Huang T, Hammarström L, Zhao Y. The Immunoglobulins: New Insights, Implications, and Applications. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419->
19. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2).
20. Roth J, Zuber C, Park S, Jang I, Lee Y, Kysela KG, et al. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. Vol. 30, Molecules and Cells. 2010. p. 497–506.
21. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn A V. Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. Vol. 13, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2012. p. 448–62.

22. Bashir H, Wani BA, Ganai BA, Mir SA. Protein Glycosylation: An Important Tool for Diagnosis or Early Detection of Diseases. In: Protein Modificomics: From Modifications to Clinical Perspectives. Elsevier; 2019. p. 339–59.
23. Kronimus Y, Dodel R, Galuska SP, Neumann S. IgG Fc N-glycosylation: Alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? Vol. 96, Journal of Autoimmunity. Academic Press; 2019. p. 14–23.
24. Hipgrave Ederveen AL, de Haan N, Baerenfaenger M, Lefeber DJ, Wuhler M. Dissecting total plasma and protein-specific glycosylation profiles in congenital disorders of glycosylation. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 2;21(20):1–16.
25. Zhou X, Motta F, Selmi C, Ridgway WM, Gershwin ME, Zhang W. Antibody glycosylation in autoimmune diseases. Vol. 20, Autoimmunity Reviews. Elsevier B.V.; 2021.
26. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol*. 2018 Nov 1;333:65–79.
27. Kennedy PGE, Graner M, Pointon T, Li X, Tanimoto K, Dennison K, et al. Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2022 Jun 1;17(1–2):218–27.
28. Vasseur JA, Goetz JA, Alley WR, Novotny M V. Smoking and lung cancer-induced changes in N-glycosylation of blood serum proteins. *Glycobiology*. 2012 Dec;22(12):1684–708.
29. Kawaguchi-Sakita N, Kaneshiro-Nakagawa K, Kawashima M, Sugimoto M, Tokiwa M, Suzuki E, et al. Serum immunoglobulin G Fc region N-glycosylation profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry can distinguish breast cancer patients from cancer-free controls. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 22;469(4):1140–5.
30. Wiecek M, Braicu EI, Oliveira-Ferrer L, Sehoul J, Blanchard V. Immunoglobulin G Subclass-Specific Glycosylation Changes in Primary Epithelial Ovarian Cancer. *Front Immunol*. 2020 May 15;11.
31. Wu Y, Liu Y, Shang Z, Liu X, Xu Y, Liu W. N-Glycomic profiling reveals dysregulated glycans related to oral cancer using MALDI-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2022 Feb 1;414(5):1881–90.
32. Gebrehiwot AG, Melka DS, Kassaye YM, Gemechu T, Lako W, Hinou H, et al. Exploring serum and immunoglobulin G N-glycome as diagnostic biomarkers for early detection of breast cancer in Ethiopian women. *BMC Cancer*. 2019 Jun 17;19(1).
33. Liu S, Cheng L, Fu Y, Liu BF, Liu X. Characterization of IgG N-glycome profile in colorectal cancer progression by MALDI-TOF-MS. *J Proteomics*. 2018 Jun 15;181:225–37.
34. Zhang Z, Cao Z, Wang J, Li Z, Wang T, Xiang Y. Serum protein N-glycome patterns reveal alterations associated with endometrial cancer and its phenotypes of differentiation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14.
35. Lee JW, Lee K, Ahn SH, Son BH, Ko BS, Kim HJ, et al. Potential of MALDI-TOF-based serum N-glycan analysis for the diagnosis and surveillance of breast cancer. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
36. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020 Dec 1;26(14):1816–21.
37. Voskuhl RR. The effect of sex on multiple sclerosis risk and disease progression. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020 Apr 1;26(5):554–60.
38. Trojano M, Lucchese G, Graziano G, Taylor B V., Simpson S, Lepore V, et al. Geographical Variations in Sex Ratio Trends over Time in Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2012 Oct 25;7(10).
39. Leffler J, Trend S, Gorman S, Hart PH. Sex-Specific Environmental Impacts on Initiation and Progression of Multiple Sclerosis. Vol. 13, Frontiers in Neurology. Frontiers Media S.A.; 2022.
40. Disteche CM, Berletch JB. X-chromosome inactivation and escape.

41. Libert C, Dejager L, Pinheiro I. The X chromosome in immune functions: When a chromosome makes the difference. Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2010. p. 594–604.
42. Schurz H, Salie M, Tromp G, Hoal EG, Kinnear CJ, Möller M. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. Vol. 13, *Human genomics*. NLM (Medline); 2019. p. 2.
43. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. Vol. 16, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 626–38.
44. Jakimovski D, Bittner S, Zivadinov R, Morrow SA, Benedict RH, Zipp F, et al. Multiple sclerosis. *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2023.
45. Compston A. Multiple Sclerosis [Internet]. 2005. Available from: <http://www.elsevier.com>
46. Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(1):3–13.
47. Dendrou CA, Fugger L, Friesen MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 545–58.
48. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. Vol. 21, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research; 2023. p. 51–64.
49. Leuven KU, Goris A, Vandebergh M, Mccauley JL, Saarela J, Cotsapas C. Genetics of multiple sclerosis: lessons from polygenicity [Internet]. Vol. 21, *Lancet Neurol*. 2022. Available from: <https://imsgc.net/>
50. Balcerac A, Louapre C. Genetics and familial distribution of multiple sclerosis: A review. Vol. 178, *a Revue Neurologique*. Elsevier Masson s.r.l.; 2022. p. 512–20.
51. Jacobs BM, Peter M, Giovannoni G, Noyce AJ, Morris HR, Dobson R. Towards a global view of multiple sclerosis genetics. *Nat Rev Neurol*. 2022 Oct 1;18(10):613–23.
52. Leuven KU, Goris A, Vandebergh M, Mccauley JL, Saarela J, Cotsapas C. Genetics of multiple sclerosis: lessons from polygenicity [Internet]. Vol. 21, *Lancet Neurol*. 2022. Available from: <https://imsgc.net/>
53. Ingelfinger F, Gerdes LA, Kavaka V, Krishnarajah S, Friebel E, Galli E, et al. Twin study reveals non-heritable immune perturbations in multiple sclerosis. *Nature*. 2022 Mar 3;603(7899):152–8.
54. Lewis PA, Spillane JE. Multiple Sclerosis. In: *The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease*. Elsevier; 2019. p. 221–51.
55. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. Vol. 26, *European Journal of Neurology*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 27–40.
56. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int*. 2013 Feb 1;92(2):77–98.
57. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. Vol. 60, *Pediatrics and Neonatology*. Elsevier (Singapore) Pte Ltd; 2019. p. 237–44.
58. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. Vol. 21, *Chemistry and Biology*. Cell Press; 2014. p. 319–29.
59. Norlin M, Wikvall K. Enzymatic activation in vitamin D signaling – Past, present and future. Vol. 742, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc.; 2023.
60. Janubová M, Žitňanová I. The effects of vitamin D on different types of cells. Vol. 202, *Steroids*. Elsevier Inc.; 2024.
61. Pierrot-Descilligny C, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosisAn update. Vol. 14, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. Elsevier B.V.; 2017. p. 35–45.

62. Rebelos E, Tentolouris N, Jude E. The Role of Vitamin D in Health and Disease: A Narrative Review on the Mechanisms Linking Vitamin D with Disease and the Effects of Supplementation. Vol. 83, *Drugs*. Adis; 2023. p. 665–85.
63. Gombash SE, Lee PW, Sawdai E, Lovett-Racke AE. Vitamin D as a Risk Factor for Multiple Sclerosis: Immunoregulatory or Neuroprotective? Vol. 13, *Frontiers in Neurology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
64. Daryabor G, Gholijani N, Kahmini FR. A review of the critical role of vitamin D axis on the immune system. Vols. 132–133, *Experimental and Molecular Pathology*. Academic Press Inc.; 2023.
65. Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR. The vitamin D receptor and T cell function. Vol. 4, *Frontiers in Immunology*. 2013.
66. Islam T, Gauderman WJ, Cozen W, Mack TM. Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins Supplemental data at www.neurology.org [Internet]. 2007. Available from: www.neurology.org
67. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. Vol. 7, *Neurology and Therapy*. Springer Healthcare; 2018. p. 59–85.
68. Willer CJ, Dyment DA, Sadovnick AD, Rothwell PM, Murray TJ, Ebers GC. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: Population based study. *Br Med J*. 2005 Jan 15;330(7483):120–3.
69. Mirmosayyeb O, Barzegar M, Afshari-Safavi A, Nehzat N, Heidari A, Emami P, et al. Evaluation of Month of Birth in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders (NMSOD) and Multiple Sclerosis (MS). *Mult Scler Int*. 2021 Jun 10;2021:1–7.
70. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein—Barr virus genome. *Nature* [Internet]. 1984;310(5974):207–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/310207a0>
71. Thorley-Lawson DA. EBV persistence-introducing the virus. In: *Epstein Barr Virus*. Springer International Publishing; 2015. p. 151–209.
72. Brennan RM, Burrows JM, Bell MJ, Bromham L, Csurhes PA, Lenarczyk A, et al. Strains of Epstein-Barr virus infecting multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*. 2010;16(6):643–51.
73. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis [Internet]. Vol. 375, *Science*. 2022. Available from: <https://www.science.org>
74. Bjornevik K, Münz C, Cohen JI, Ascherio A. Epstein—Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. Vol. 19, *Nature Reviews Neurology*. Nature Research; 2023. p. 160–71.
75. Berger JR, Kakara M. The elimination of circulating Epstein-Barr virus infected B cells underlies anti-CD20 monoclonal antibody activity in multiple sclerosis: A hypothesis. *Mult Scler Relat Disord*. 2022 Mar 1;59.
76. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the Blood-Brain Barrier in Multiple Sclerosis. Vol. 45, *Archives of Medical Research*. Elsevier Inc.; 2014. p. 687–97.
77. Mizze MR, van Doorn R, Prat A, De Vries HE. Inflammation at the blood–brain barrier in multiple sclerosis. *Topics in Medicinal Chemistry*. 2014;10:117–42.
78. Schreiner TG, Romanescu C, Popescu BO. The Blood–Brain Barrier—A Key Player in Multiple Sclerosis Disease Mechanisms. Vol. 12, *Biomolecules*. MDPI; 2022.
79. Attfields KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. Vol. 22, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2022. p. 734–50.
80. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. Vol. 97, *Neuron*. Cell Press; 2018. p. 742–68.

81. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. Vol. 97, *Neuron*. Cell Press; 2018. p. 742–68.
82. Miljković D, Spasojević I. Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Vol. 19, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2013. p. 2286–334.
83. Waanleenuwat P, Iwanowski P. Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis. Vol. 36, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. Elsevier B.V.; 2019.
84. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. Vol. 14, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2015. p. 406–19.
85. Feki S, Damak M, Sakka S, Ben Ali Y, Mejdoub S, Bouattour N, et al. Intrathecal B cell-related markers for an optimized biological investigation of multiple sclerosis patients. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).
86. Pikor N, Gommerman JL. B cells in MS: Why, where and how? Vol. 1, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2012. p. 123–30.
87. Sun W, Zhu C, Li Y, Wu X, Shi X, Liu W. B cell activation and autoantibody production in autoimmune diseases. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. Bailliere Tindall Ltd; 2024.
88. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: A consensus approach. Vol. 14, *Multiple Sclerosis*. SAGE Publications Ltd; 2008. p. 1157–74.
89. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Vol. 17, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2018. p. 162–73.
90. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
91. Luque FA, Jaffe SL. Cerebrospinal Fluid Analysis in Multiple Sclerosis. Vol. 79, *International Review of Neurobiology*. 2007. p. 341–56.
92. Sprawls P. *Magnetic Resonance Imaging Principles, Methods, and Techniques*. 2000.
93. Grover VPB, Tognarelli JM, Crossey MME, Cox IJ, Taylor-Robinson SD, McPhail MJW. *Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians*. Vol. 5, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. Elsevier B.V.; 2015. p. 246–55.
94. Haemond CC, Bakshi R. Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 May 1;8(5).
95. Hurwitz BJ. The diagnosis of multiple sclerosis and the clinical subtypes Review: Management Updates. Vol. 12, *Ann Indian Acad Neurol*. 2009.
96. Gilhus NE, Barnes MP, Brainin M. *European Handbook of Neurological Management*. 2nd ed. Vol. Volume 1. Wiley-Blackwell; 2010.
97. Saadeh RS, Ramos PA, Algeciras-Schimmich A, Flanagan EP, Pittock SJ, Willrich MA. An Update on Laboratory-Based Diagnostic Biomarkers for Multiple Sclerosis and Beyond. Vol. 68, *Clinical chemistry*. NLM (Medline); 2022. p. 1134–50.
98. Gastaldi M, Zardini E, Franciotta D. An update on the use of cerebrospinal fluid analysis as a diagnostic tool in multiple sclerosis. Vol. 17, *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 31–46.
99. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt I. *Roitt's Essential Immunology*. 13th ed. WILEY Blackwell; 2013.
100. Murphy K (Kenneth M), Weaver C, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 904 p.
101. Honjō T, Reth M, Radbruch A (Andreas), Alt FW. *Molecular biology of B cells*. 563 p.

102. Daëron M, Nimmerjahn F. Fc Receptors [Internet].
103. Mix E, Goertsches R, Zett UK. Immunoglobulins - Basic considerations. In: Journal of Neurology. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG; 2006.
104. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2).
105. Greenspan NS, Cavacini LA. Immunoglobulin Function. In: Clinical Immunology: Principles and Practice. Elsevier; 2019. p. 223-233.e1.
106. Liu S, Liu X. IgG N-glycans. In: Advances in Clinical Chemistry. Academic Press Inc.; 2021. p. 1–47.
107. Huhn C, Selman MHJ, Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhrer M. IgG glycosylation analysis. Vol. 9, Proteomics. 2009. p. 882–913.
108. Cobb BA. The history of IgG glycosylation and where we are now. Vol. 30, Glycobiology. Oxford University Press; 2021. p. 202–13.
109. Van Coillie J, Schulz MA, Bentlage AEH, de Haan N, Ye Z, Geerdes DM, et al. Role of N-Glycosylation in FcγRIIIa interaction with IgG. Front Immunol. 2022 Sep 9;13.
110. Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. Glycans - the third revolution in evolution. Front Genet. 2014;5(MAY).
111. Varki A, Cummings R, Esko J, Stanley P, Hart G, Aebi M, et al. Essentials of Glycobiology. 4th ed. Vol. 4th. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022.
112. Varki A. Biological roles of glycans. Glycobiology. 2017 Jan 1;27(1):3–49.
113. Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, Petrović T, Deriš H, Wuhrer M, et al. High-Throughput Glycomic Methods. Vol. 122, Chemical Reviews. American Chemical Society; 2022. p. 15865–913.
114. Scheper AF, Schofield J, Bohara R, Ritter T, Pandit A. Understanding glycosylation: Regulation through the metabolic flux of precursor pathways. Vol. 67, Biotechnology Advances. Elsevier Inc.; 2023.
115. Wang T, Liu L, Voglmeir J. mAbs N-glycosylation: Implications for biotechnology and analytics. Vol. 514, Carbohydrate Research. Elsevier Ltd; 2022.
116. Yu X, Baruah K, Scanlan CN, Crispin M. Antibody Glycosylation. In: Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity. Elsevier Inc.; 2013. p. 179–94.
117. Hayes JM, Cosgrave EFJ, Struwe WB, Wormald M, Davey GP, Jefferis R, et al. Glycosylation and Fc receptors. Vol. 382, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Verlag; 2014. p. 165–99.
118. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beccheli I, et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences. 2014 Jul 1;69(7):779–89.
119. Chen G, Wang Y, Qiu L, Qin X, Liu H, Wang X, et al. Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. J Proteomics. 2012 Jun 6;75(10):2824–34.
120. Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Pribić T, Vilaj M, Černigoj U, Vidič J, et al. Comparative analysis of transferrin and IgG N-glycosylation in two human populations. Commun Biol. 2023 Dec 1;6(1).
121. Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. Molecular and Cellular Proteomics. 2011;10(10).

122. Liu J, Dolikun M, Štambuk J, Trbojević-Akmačić I, Zhang J, Wang H, et al. The association between subclass-specific IgG Fc N-glycosylation profiles and hypertension in the Uygur, Kazak, Kirgiz, and Tajik populations. *J Hum Hypertens*. 2018 Sep 1;32(8–9):555–63.
123. Gudelj I, Keser T, Vučković F, Škaro V, Goreta SŠ, Pavić T, et al. Estimation of human age using N-glycan profiles from bloodstains. *Int J Legal Med*. 2015 Sep 28;129(5):955–61.
124. Lee SB, Bose S, Ahn SH, Son BH, Ko BS, Kim HJ, et al. Breast cancer diagnosis by analysis of serum N-glycans using MALDI-TOF mass spectroscopy. *PLoS One*. 2020 Apr 1;15(4).
125. Lee JW, Lee K, Ahn SH, Son BH, Ko BS, Kim HJ, et al. Potential of MALDI-TOF-based serum N-glycan analysis for the diagnosis and surveillance of breast cancer. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
126. Goulabchand R, Vincent T, Batteux F, Eliaou J français, Guilpain P. Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases. Vol. 13, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier; 2014. p. 742–50.
127. Flevaris K, Kontoravdi C. Immunoglobulin G N-glycan Biomarkers for Autoimmune Diseases: Current State and a Glycoinformatics Perspective. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
128. Turčić A, Radovani B, Vogrinc Z, Habek M, Rogić D, Gabelić T, et al. Higher MRI lesion load in multiple sclerosis is related to the N-glycosylation changes of cerebrospinal fluid immunoglobulin G. *Mult Scler Relat Disord*. 2023 Nov 1;79.
129. Kobeissy F, Kobaisi A, Peng W, Barsa C, Goli M, Sibahi A, et al. Glycomic and Glycoproteomic Techniques in Neurodegenerative Disorders and Neurotrauma: Towards Personalized Markers. Vol. 11, *Cells*. MDPI; 2022.
130. Qin W, Pei H, Li X, Li J, Yao X, Zhang R. Serum Protein N-Glycosylation Signatures of Neuroblastoma. *Front Oncol*. 2021 Mar 16;11.
131. Rebelo AL, Chevalier MT, Russo L, Pandit A. Role and therapeutic implications of protein glycosylation in neuroinflammation. Vol. 28, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2022. p. 270–89.
132. Pradeep P, Kang H, Lee B. Glycosylation and behavioral symptoms in neurological disorders. Vol. 13, *Translational Psychiatry*. Springer Nature; 2023.
133. Kolarich D, Lepenies B, Seeberger PH. Glycomics, glycoproteomics and the immune system. Vol. 16, *Current Opinion in Chemical Biology*. 2012. p. 214–20.
134. Rodriguez EL, Poddar S, Iftekhhar S, Suh K, Woolfork AG, Ovbude S, et al. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. Vol. 1157, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Elsevier B.V.; 2020.
135. Moser AC, Hage DS. Immunoaffinity chromatography: An introduction to applications and recent developments. Vol. 2, *Bioanalysis*. 2010. p. 769–90.
136. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. Vol. 74, *Reviews in Molecular Biotechnology*. 2001.
137. Kinoshita M, Yamada K. Recent advances and trends in sample preparation and chemical modification for glycan analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2022 Jan 5;207.
138. Kim DS, Hahn Y. The acquisition of novel N-glycosylation sites in conserved proteins during human evolution. *BMC Bioinformatics*. 2015 Feb 28;16(1).
139. Vilaj M, Lauc G, Trbojević-Akmačić I. Evaluation of different PNGase F enzymes in immunoglobulin G and total plasma N-glycans analysis. *Glycobiology*. 2021 Jan 1;31(1):2–7.
140. Riley NM, Bertozzi CR, Pitteri SJ. A pragmatic guide to enrichment strategies for mass spectrometry-based glycoproteomics. Vol. 20, *Molecular and Cellular Proteomics*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2021.

141. Selman MHJ, Hemayatkar M, Deelder AM, Wuhrer M. Cotton HILIC SPE microtips for microscale purification and enrichment of glycans and glycopeptides. *Anal Chem.* 2011 Apr 1;83(7):2492–9.
142. Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. Vol. 397, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010. p. 3457–81.
143. Melmer M, Stangler T, Schiefermeier M, Brunner W, Toll H, Rupprechter A, et al. HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Sep;398(2):905–14.
144. Harvey DJ. An Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2019–2020. Vol. 42, *Mass Spectrometry Reviews*. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 1984–2206.
145. Israr MZ, Bernieh D, Salzano A, Cassambai S, Yazaki Y, Suzuki T. Matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) mass spectrometry (MS): Basics and clinical applications. Vol. 58, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. De Gruyter; 2020. p. 883–96.
146. de Haan N, Yang S, Cipollo J, Wuhrer M. Glycomics studies using sialic acid derivatization and mass spectrometry. Vol. 4, *Nature Reviews Chemistry*. Nature Research; 2020. p. 229–42.
147. Nishikaze T. Sialic acid derivatization for glycan analysis by mass spectrometry. Vol. 95, *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. Japan Academy; 2019. p. 523–37.
148. Pongracz T, Wuhrer M, de Haan N. Expanding the reaction space of linkage-specific sialic acid derivatization. *Molecules*. 2019 Oct 8;24(19).
149. Pongracz T, Verhoeven A, Wuhrer M, Noortje De Haan &. The structure and role of lactone intermediates in linkage-specific sialic acid derivatization reactions. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09971-7>
150. Reiding KR, Lonardi E, Hipgrave Ederveen AL, Wuhrer M. Ethyl esterification for MALDI-MS analysis of protein glycosylation. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2016. p. 151–62.
151. Ewald JD, Zhou G, Lu Y, Kolic J, Ellis C, Johnson JD, et al. Web-based multi-omics integration using the Analyst software suite. *Nat Protoc.* 2024;
152. Cho YT, Su H, Wu WJ, Wu DC, Hou MF, Kuo CH, et al. Biomarker Characterization by MALDI-TOF/MS. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Academic Press Inc.; 2015. p. 209–54.
153. Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C, Killestein J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis - The long road to clinical application. *Nat Rev Neurol.* 2015 Oct 1;11(10):585–96.
154. Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA, Kümpfel T, Derfuss T, Khademi M, et al. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Neuroinflammation.* 2015 Dec 18;12(1).
155. Cvetko A, Kifer D, Gornik O, Klarić L, Visser E, Lauc G, et al. Glycosylation alterations in multiple sclerosis show increased proinflammatory potential. *Biomedicines.* 2020 Oct 1;8(10):1–14.
156. Kennedy PGE, Graner M, Pointon T, Li X, Tanimoto K, Dennison K, et al. Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology.* 2022 Jun 1;17(1–2):218–27.
157. Zhou X, Motta F, Selmi C, Ridgway WM, Gershwin ME, Zhang W. Antibody glycosylation in autoimmune diseases. Vol. 20, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2021.
158. Peschke B, Keller CW, Weber P, Quast I, Lünemann JD. Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Front Immunol.* 2017 Jun 6;8(JUN).

159. Kuhns S, Shu J, Xiang C, Guzman R De, Zhang Q, Bretzlaff W, et al. Differential influence on antibody dependent cellular phagocytosis by different glycoforms on therapeutic Monoclonal antibodies. *J Biotechnol.* 2020 Jun 20;317:5–15.
160. Dekkers G, Treffers L, Plomp R, Bentlage AEH, Boer M de, Koeleman CAM, et al. Decoding the human immunoglobulin G-glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-receptor- and complement-mediated-effector activities. *Front Immunol.* 2017 Aug 2;8(AUG).
161. Brandt AU, Sy M, Bellmann-Strobl J, Newton BL, Pawling J, Zimmermann HG, et al. Association of a Marker of N-Acetylglucosamine with Progressive Multiple Sclerosis and Neurodegeneration. *JAMA Neurol.* 2021 Jul 1;78(7):842–52.



8 EKLER

Ek 1 A: Glikanlara ait Shapiro-Wilk sonuçları

Glikan İsmi	w değeri	p değeri	Glikan İsmi	w Değeri	p Değeri
H3N3	0.37157	9.72e-19	H5N4E1	0.87312	9.38e0-8
H3N3F1	0.27753	5.96e-20	H5N5F1	0.45617	1.59e-17
H4N3	0.36630	8.25e-19	H4N5E1	0.60478	5.31e-15
H3N4	0.73810	4.59e-12	H6N4L1	0.12960	1.24e-21
H4N3F1	0.32104	2.09e-19	H4N7	0.12960	1.24e-21
H5N3	0.28803	8.03e-20	H5N4F1E1	0.98322	0.23459
H3N4F1	0.98904	0.58742	H4N5F1E1	0.96010	0.00409
H4N4	0.93861	1.59e0-4	H5N5E1	0.90866	3.70e0-6
H3N5	0.67972	1.86e-13	H5N4E1L1	0.31754	1.89e-19
H7N2	0.43086	6.67e-18	H5N4E2	0.63411	2.01e-14
H4N4F1	0.97940	0.11928	H5N5F1E1	0.94445	3.64e0-4
H5N4	0.89833	1.18e0-6	H6N5E1	0.16072	2.67e-21
H3N5F1	0.98167	0.17889	H5N4F1L2	0.22611	1.45e-20
H4N5	0.85710	2.19e0-8	H4N6F1E1	0.60721	5.91e-15
H8N2	0.80118	2.69e-10	H5N4F1E2	0.97239	0.03380
H5N3E1	0.18429	4.86e-21	H6N5F1E1	0.13939	1.57e-21
H5N4F1	0.99165	0.79554	H5N5E2	0.77974	6.19e-11
H6N4	0.34184	3.89e-19	H5N5F1E2	0.95029	8.67e0-4
H4N5F1	0.99210	0.82874	H6N5E1L2	0.12960	1.24e-21
H5N5	0.49993	7.68e-17	H6N5E2L1	0.29102	8.74e-20
H9N2	0.72662	2.36e-12	H6N5E3	0.13939	1.57e-21
H4N4F1E1	0.70608	7.49e-13	H6N5F1E1L2	0.20591	8.51e-21

Ek 1 B: Glikanlara ait Levene testi sonuçları

Glikan İsmi	F Değeri	P değeri	Glikan İsmi	F Değeri	P Değeri
H3N3	4.02081	0.00468	H5N4E1	1.37977	0.24680
H3N3F1	1.21333	0.31032	H5N5F1	0.93667	0.44623
H4N3	1.25906	0.29159	H4N5E1	3.10676	0.01890
H3N4	0.71725	0.58220	H6N4L1	1.29683	0.27686
H4N3F1	5.88244	2.84e0-4	H4N7	1.29683	0.27686
H5N3	1.78571	0.13809	H5N4F1E1	1.92984	0.11175
H3N4F1	0.44320	0.77708	H4N5F1E1	6.43056	1.27e0-4
H4N4	3.24511	0.01530	H5N5E1	5.03160	0.00101
H3N5	6.82427	7.15e0-5	H5N4E1L1	1.42865	0.23047
H7N2	1.62458	0.17441	H5N4E2	2.14540	0.08115
H4N4F1	2.29091	0.06525	H5N5F1E1	2.50260	0.04741
H5N4	1.80693	0.13387	H6N5E1	0.51618	0.72400
H3N5F1	1.00498	0.40895	H5N4F1L2	0.91970	0.45588
H4N5	1.72211	0.15148	H4N6F1E1	22.29640	5.28e-13
H8N2	6.30293	1.53e0-4	H5N4F1E2	3.90123	0.00561
H5N3E1	0.79756	0.52969	H6N5F1E1	1.84083	0.12739
H5N4F1	1.10698	0.35788	H5N5E2	3.74101	0.00717
H6N4	1.27828	0.28401	H5N5F1E2	7.09930	4.80e0-5
H4N5F1	1.99349	0.10172	H6N5E1L2	1.29683	0.27686
H5N5	3.78963	0.00666	H6N5E2L1	1.77526	0.14021
H9N2	17.21163	1.20e-10	H6N5E3	1.84083	0.12739
H4N4F1E1	1.97611	0.10437	H6N5F1E1L2	3.11716	0.01861

Ek 1 C: Glikanlara ait One-Way ANOVA sonuçları

Glikan İsmi	F Değeri	P değeri	Glikan İsmi	F Değeri	P Değeri
H3N3	NaN	NaN	H5N4E1	111.791	0.39232
H3N3F1	0.32402	0.85640	H5N5F1	206.036	0.15007
H4N3	NaN	NaN	H4N5E1	0.70691	0.60380
H3N4	0.62411	0.65499	H6N4L1	NaN	NaN
H4N3F1	NaN	NaN	H4N7	NaN	NaN
H5N3	NaN	NaN	H5N4F1E1	273.901	0.07657
H3N4F1	319.938	0.05729	H4N5F1E1	686.232	0.00404
H4N4	0.93936	0.47558	H5N5E1	133.238	0.31523
H3N5	123.364	0.35428	H5N4E1L1	NaN	NaN
H7N2	NaN	NaN	H5N4E2	253.647	0.08779
H4N4F1	0.88090	0.50412	H5N5F1E1	146.737	0.27289
H5N4	179.687	0.19327	H6N5E1	NaN	NaN
H3N5F1	1.720.598	2.30e-5	H5N4F1L2	NaN	NaN
H4N5	110.464	0.40262	H4N6F1E1	NaN	NaN
H8N2	NaN	NaN	H5N4F1E2	234.209	0.11462
H5N3E1	NaN	NaN	H6N5F1E1	NaN	NaN
H5N4F1	1.173.896	3.09e-4	H5N5E2	0.79608	0.55065
H6N4	NaN	NaN	H5N5F1E2	321.852	0.05158
H4N5F1	160.367	0.23758	H6N5E1L2	NaN	NaN
H5N5	NaN	NaN	H6N5E2L1	NaN	NaN
H9N2	NaN	NaN	H6N5E3	NaN	NaN
H4N4F1E1	0.98876	0.44807	H6N5F1E1L2	NaN	NaN

Ek 1 D: Glikan gruplarına ait Shapiro Wilk testi sonuçları

Glikan Grubu	w değeri	p değeri	Glikan Grubu	w değeri	p değeri
GG1	5.30169	6.74e-4	GG10	1.97430	0.10465
GG2	0.90121	0.46656	GG11	2.66087	0.03730
GG3	3.87927	0.00580	GG12	0.57877	0.67872
GG4	3.30405	0.01398	GG13	3.93621	0.00532
GG5	2.58592	0.04179	GG14	0.31672	0.86616
GG6	0.37659	0.82484	GG15	3.53961	0.00975
GG7	0.12758	0.97210	GG16	0.88668	0.47508
GG8	2.78588	0.03084	GG17	4.13072	0.00396
GG9	2.93691	0.02450	GG18	0.43151	0.78555

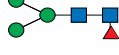
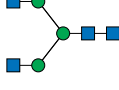
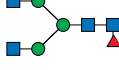
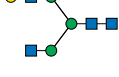
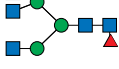
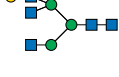
Ek 1 E: Glikan gruplarına ait Levene testi sonuçları

Glikan Grubu	F değeri	p değeri	Glikan Grubu	w değeri	p değeri
GG1	0.73303	3.41e-12	GG10	0.95401	0.00154
GG2	0.21029	9.55e-21	GG11	0.97954	0.12248
GG3	0.74595	7.33e-12	GG12	0.36870	8.89e-19
GG4	0.71278	1.08e-12	GG13	0.99215	0.83208
GG5	0.97893	0.10961	GG14	0.99167	0.79657
GG6	0.90906	3.87e0-6	GG15	0.79829	2.19e-10
GG7	0.95519	0.00185	GG16	0.99052	0.70686
GG8	0.98712	0.44588	GG17	0.96734	0.01389
GG9	0.88088	1.98e0-7	GG18	0.98924	0.60381

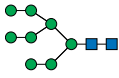
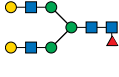
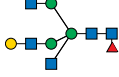
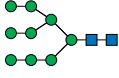
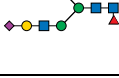
Ek 1 F:Glikan gruplarına ait One-Way ANOVA sonuçları

Glikan Grubu	F değeri	p değeri	Glikan Grubu	w değeri	p değeri
GG1	NaN	NaN	GG10	1.87769	0.18113
GG2	NaN	NaN	GG11	2.31091	0.11709
GG3	NaN	NaN	GG12	1.58928	0.22056
GG4	NaN	NaN	GG13	2.83006	0.07357
GG5	2.27158	0.12294	GG14	7.09923	0.00422
GG6	0.19251	0.93746	GG15	1.42542	0.28634
GG7	0.16826	0.95024	GG16	8.70885	0.00158
GG8	2.96021	0.06661	GG17	5.41150	0.00944
GG9	1.34242	0.31538	GG18	6.75878	0.00482

Ek 1.G: Çalışmada tespit edilen bazı N-Glikanlar ve özellikleri

N-Glikan Adı	Teorik m/z (M+Na)	Şematik Görüntüsü
H3N3F1	1282,4543	
H3N4	1339,4757	
H3N4F1	1485,5337	
H4N4	1501,5286	
H3N5	1542,5551	
H4N4F1	1647,5865	
H5N4	1663,5814	
H3N5F1	1688,613	
H4N5	1704,6079	

Ek 1.G: Çalışmada tespit edilen bazı N-Glikanlar ve özellikleri (Devam)

H8N2	1743,5811	
H5N4F1	1809,6393	
H4N5F1	1850,6659	
H9N2	1905,6339	
H4N4F1E1	1966,7132	
H5N5F1	2012,7187	
H5N4F1E1	2128,766	
H4N5F1E1	2169,7926	
H5N4E2	2301,8348	
H5N4F1E2	2447,8927	

Ek 1.H: N-glikan grupları ve grupların hesaplanması

Grup ismi	Açıklama	Formül
GG1	Oligomannozik glikanlar	$(1 * (H5N2 + H6N2 + H7N2 + H8N2 + H9N2)) / (1 * (H5N2 + H3N4 + H6N2 + H3N4F1 + H4N4 + H7N2 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H8N2 + H4N3F1E1 + H5N3E1 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H9N2 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H6N5E1 + H4N6F1E1 + H5N4F1E2 + H6N5F1E1 + H5N5E2 + H5N5F1E2 + H6N5E2 + H6N5E3 + H6N5F1E3))$
GG2	Hibrit Yapılı glikanlar	$1 * (H5N3E1)) / (1 * (H5N2 + H3N4 + H6N2 + H3N4F1 + H4N4 + H7N2 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H8N2 + H4N3F1E1 + H5N3E1 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H9N2 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H6N5E1 + H5N4F1L2 + H4N6F1E1 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H6N5F1E1 + H5N5E2 + H6N5L2 + H6N5E1L1 + H5N5F1E2 + H6N5E2 + H6N5F1E1L1 + H6N5E1L2 + H6N5E2L1 + H6N5E3 + H6N5F1L3 + H6N5F1E1L2 + H6N5F1E2L1 + H6N5F1E3))$
GG3	Kompleks yapılı glikanlar	$(1 * (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H6N5E1 + H5N4F1L2 + H4N6F1E1 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H6N5F1E1 + H5N5E2 + H6N5L2 + H6N5E1L1 + H5N5F1E2 + H6N5E2 + H6N5F1E1L1 + H6N5E1L2 + H6N5E2L1 + H6N5E3 + H6N5F1L3 + H6N5F1E1L2 + H6N5F1E2L1 + H6N5F1E3)) / (1 * (H5N2 + H3N4 + H6N2 + H3N4F1 + H4N4 + H7N2 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H8N2 + H4N3F1E1 + H5N3E1 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H9N2 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H6N5E1 + H5N4F1L2 + H4N6F1E1 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H6N5F1E1 + H5N5E2 + H6N5L2 + H6N5E1L1 + H5N5F1E2 + H6N5E2 + H6N5F1E1L1 + H6N5E1L2 + H6N5E2L1 + H6N5E3 + H6N5F1L3 + H6N5F1E1L2 + H6N5F1E2L1 + H6N5F1E3))$
GG4	İki antenli glikanlar	$(1 * (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H5N2 + H3N4 + H6N2 + H3N4F1 + H4N4 + H7N2 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H8N2 + H4N3F1E1 + H5N3E1 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H9N2 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H6N5E1 + H5N4F1L2 + H4N6F1E1 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H6N5F1E1 + H5N5E2 + H6N5L2 + H6N5E1L1 + H5N5F1E2 + H6N5E2 + H6N5F1E1L1 + H6N5E1L2 + H6N5E2L1 + H6N5E3 + H6N5F1L3 + H6N5F1E1L2 + H6N5F1E2L1 + H6N5F1E3))$
GG5	Bisektik glikanlar	$(1 * (H3N5F1 + H4N5 + H4N5F1 + H5N5F1 + H5N5F1E1 + H5N5E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H5N2 + H3N4 + H6N2 + H3N4F1 + H4N4 + H7N2 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H8N2 + H4N3F1E1 + H5N3E1 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H9N2 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H6N5E1 + H5N4F1L2 + H4N6F1E1 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H6N5F1E1 + H5N5E2 + H6N5L2 + H6N5E1L1 + H5N5F1E2 + H6N5E2 + H6N5F1E1L1 + H6N5E1L2 + H6N5E2L1 + H6N5E3 + H6N5F1L3 + H6N5F1E1L2 + H6N5F1E2L1 + H6N5F1E3))$

Ek 1.H N-glikan grupları ve grupların hesaplanması (Devam)

GG6	Fukozlanmış glikanlar		$(1 * (H3N4F1 + H4N4F1 + H3N5F1 + H4N3F1E1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H4N6F1E1 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H6N5F1E1 + H5N5F1E2 + H6N5F1E1L1 + H6N5F1L3 + H6N5F1E1L2 + H6N5F1E2L1 + H6N5F1E3)) / (1 * (H5N2 + H3N4 + H6N2 + H3N4F1 + H4N4 + H7N2 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H8N2 + H4N3F1E1 + H5N3E1 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H9N2 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H6N5E1 + H5N4F1L2 + H4N6F1E1 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H6N5F1E1 + H5N5E2 + H6N5L2 + H6N5E1L1 + H5N5F1E2 + H6N5E2 + H6N5F1E1L1 + H6N5E1L2 + H6N5E2L1 + H6N5E3 + H6N5F1L3 + H6N5F1E1L2 + H6N5F1E2L1 + H6N5F1E3))$
GG7	İki antenli fukozlanmış glikanlar		$(1 * (H3N4F1 + H4N4F1 + H3N5F1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2))$
GG8	Bisektik iki antenli glikanlar		$(1 * (H3N5F1 + H4N5 + H4N5F1 + H5N5F1 + H5N5F1E1 + H5N5E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2))$
GG9	Bisektik iki antenli fukozlanmamış glikanlar		$(1 * (H4N5 + H5N5E2)) / (1 * (H3N4 + H4N4 + H5N4 + H4N5 + H4N4E1 + H5N4E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5E2))$
GG10	Bisektik iki antenli fukozlanmış glikanlar		$(1 * (H3N5F1 + H4N5F1 + H5N5F1 + H5N5F1E1 + H5N5F1E2)) / (1 * (H3N4F1 + H4N4F1 + H3N5F1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5F1E2))$
GG11	İki antenli siyalilasyona uğramış glikanlar		$(1/2 * (H4N4E1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1) + 2/2 * (H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2))$
GG12	İki antenli siyalilasyona uğramış fukozlanmamış glikanlar		$(1/2 * (H4N4E1 + H5N4E1) + 2/2 * (H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5E2)) / (1 * (H3N4 + H4N4 + H5N4 + H4N5 + H4N4E1 + H5N4E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5E2))$
GG13	İki antenli siyalilasyona uğramış fukozlanmış glikanlar		$(1/2 * (H4N4F1E1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1) + 2/2 * (H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H3N4F1 + H4N4F1 + H3N5F1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5F1E2))$

Ek 1.H N-glikan grupları ve grupların hesaplanması (Devam)

GG14	Agalaktozillenmiş iki antenli glikanlar	$(H3N4 + H3N4F1 + H3N5 + H3N5F1) / (1 * (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H3N5 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H4N4L1 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H5N5 + H5N4L1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H4N5E1 + H5N4F1L1 + H5N4F1E1 + H4N5F1E1 + H5N5E1 + H5N4E1L1 + H5N5F1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1L2 + H5N5F1E1L1 + H5N5F1E2))$
GG15	İki antenli galaktozillenmiş fukozlanmamış glikanlar	$(1/2 * (H4N4 + H4N5 + H4N4E1) + 2/2 * (H5N4 + H5N4E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5E2)) / (1 * (H3N4 + H4N4 + H5N4 + H4N5 + H4N4E1 + H5N4E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5E2))$
GG16	İki antenli galaktozillenmiş fukozlanmamış glikanlar	$(1/2 * (H4N4F1 + H4N5F1 + H4N4F1E1) + 2/2 * (H5N4F1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H3N4F1 + H4N4F1 + H3N5F1 + H5N4F1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5F1E2))$
GG17	İki antenli galaktozlarından siyalilasyonlanmış glikanlar	$(1/2 * (H4N4E1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N5F1E1) + 2/2 * (H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2))$
GG18	Galaktozillenmiş iki antenli glikanlar	$(1/2 * (H4N4 + H4N4F1 + H4N5 + H4N4E1 + H4N5F1 + H4N4F1E1) + 2/2 * (H5N4 + H5N4F1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2)) / (1 * (H3N4 + H3N4F1 + H4N4 + H4N4F1 + H5N4 + H3N5F1 + H4N5 + H5N4F1 + H4N4E1 + H4N5F1 + H4N4F1E1 + H5N4E1 + H5N5F1 + H5N4L1F1 + H5N4F1E1 + H5N4L2 + H5N4E1L1 + H5N4E2 + H5N5F1E1 + H5N4F1L2 + H5N4F1E1L1 + H5N4F1E2 + H5N5E2 + H5N5F1E2))$

Ek 2. Etik Kurul Onay Formu



Ek 2.Etik Kurul Onay Formu (Devam)



9 ÖZGEÇMİŞ

