

**SÜT WHEY PROTEİNLERİNİN KÜTLE SPEKTROMETRİK  
YÖNTEMLERLE N-GLİKAN PROFİLLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF N-GLYCAN PROFILES OF MILK  
WHEY PROTEINS BY MASS SPECTROMETRIC METHODS**

**NAZİRE BARLAS**

**PROF. DR. BEKİR SALİH**

**Tez Danışmanı**

**DR. ÖĞRETİM ÜYESİ HACI MEHMET KAYILI**

**Eş Danışman**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

## ÖZET

# SÜT WHEY PROTEİNLERİNİN KÜTLE SPEKTROMETRİK YÖNTEMLERLE N-GLİKAN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

**Nazire BARLAS**

**Yüksek Lisans, Kimya Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH**

**Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Hacı Mehmet KAYILI**

**Ocak 2020, 68 sayfa**

Post-translasyonel modifikasyonlar, birçok biyolojik faaliyeti kontrol eder ve protein yapılarında yaklaşık 300 farklı post-translasyonel modifikasyonun meydana geldiği bilinmektedir. Glikozilasyon, proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarının en yaygın şekillerinden biridir. Glikozilasyon sonucu proteinlere eklenen glikanlar; immünolojik cevabın modifikasyonu, proteinlerin tanınması, hedeflenmesi ve katlanması gibi önemli rollere sahiptir. Glikan çeşitliliğinin hücrel faaliyetlerdeki işlevinin anlaşılması oldukça önemlidir. Glikanlar hücre içi etkileşim mekanizmalarında kritik rol oynamaktadırlar. Özellikle bağışıklık sisteminde, antikorların antijenleri tanımlarında kritik işlevlere sahiptirler.

Yeni doğanların sağlıklı büyümesi için gerekli olan besleyici bileşenleri içeren karmaşık bir biyolojik matriks olan sütün doğal bir koruyucu fonksiyonu vardır. Sütün antibakteriyal, antimikrobiyal ve bağışıklık sistemine katkıda bulunması gibi önemli fonksiyonları whey proteinlerine atfedilmiştir. Süt proteinlerinin post-

translasyonel modifikasyonları, sadece bileşimlerinin karmaşıklığını genişletmekle kalmamış aynı zamanda onların biyolojik işlevlerine de katkıda bulunmuştur. Sütün biyolojik işlevlerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve hem tedavi amaçlı kullanılabilmesi hem de anne sütünün yerine ikame edebilecek süt türünün belirlenebilmesi için süt whey proteinlerinin N-glikan profillerinin çıkarılması önemlidir. Süt glikoproteinleri ile ilişkili olan glikanlar, özellikle de biyolojik özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle süt whey proteinlerinin glikozilasyon analizlerinin güvenilir tekniklerle yapılması gerekmektedir. Bu tez kapsamında, inek, keçi, eşek, manda ve anne sütü olmak üzere 5 farklı süt tipi kullanılarak bu türlerin N-glikan analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. N-glikanların analizleri için kütle spektrometrik cihazlarda sağladığı avantaj nedeniyle prokainamid ile etiketleme metodu seçilmiştir. Bu süreçte tüm analizler hidrofilik etkileşim kromatografisi temelinde floresans ve kütle spektrometrik dedektörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucu her bir türe ait glikan dizilimleri belirlenmiştir. Anne, inek, keçi, manda ve eşek için sırasıyla 27, 24, 30, 20 ve 29 adet MS/MS düzeyinde N-glikan yapısı tespit edilmiştir. Her bir türe ait N-glikan yapılarının göreceli bollukları belirlenerek türler arasında kıyaslamalar yapılmıştır. Ayrıca, glikan yapıları ortak özelliklerine göre gruplandırılarak ilave karşılaştırmalar yapılmıştır. H6N2, H4N4F1, H5N4F1, H5N4S1, H5N4F1S1 ve H5N4F1S2 glikanlarının tüm sütte ortak olarak bulunduğu belirlenmiştir. Siyalillenme oranına göre en fazla siyalik asit içeren N-glikan tiplerinin keçi sütünde olduğu belirlendi. Fukozlanma bakımından değerlendirildiğinde ise keçi sütü whey glikomlarının yüksek oranda fukozlandığı belirlenmiştir. Bu dağılımı sırasıyla insan, manda, inek, eşek türlerinin izlediği belirlendi. O-asetillenmiş siyalik asit içeren N-glikan yapıları sadece eşek sütünde tespit edilmiştir. Bu çalışmayla, eşek ve manda sütünün glikan analizleri ilk defa yapılmıştır. Ve tüm türler ilk defa aynı yöntem ve cihaz kullanılarak karşılaştırılmıştır. Süt proteinlerinin N-glikan yapısının belirlenmesinde prokainamid ile etiketleme ve HILIC-FLD-QTOF-MS/MS yöntemi kullanılarak güçlü bir biyoanalitik yöntem geliştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler: süt whey proteini, N-glikan, kütle spektrometrisi, HILIC, prokainamid, glikomiks**

## **ABSTRACT**

### **DETERMINATION OF N-GLYCAN PROFILES OF MILK WHEY PROTEINS BY MASS SPECTROMETRIC METHODS**

**Nazire BARLAS**

**Master of Science, Department of Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH**

**Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Hacı Mehmet KAYILI**

**January 2020, 68 pages**

Post-translational modifications control many biological activities and it is known that about 300 different post-translational modifications occur in protein structures. Glycosylation is one of the most common forms of post-translational modifications of proteins. Glycans added to proteins as a result of glycosylation have important roles such as modification of immunological response, recognition, targeting and folding of proteins. It is important to understand the function of glycan diversity in cellular activities. Glycans play a critical role in intracellular interaction mechanisms. Particularly in the immune system, antibodies have critical functions in recognizing antigens.

Milk, a complex biological matrix containing nutritional components necessary for the healthy growth of newborns, has a natural protective function. The important functions of milk such as antibacterial, antimicrobial and contributing to the

immune system have been attributed to whey proteins. Post-translational modifications of milk proteins not only expanded the complexity of their composition, but also contributed to their biological function. N-glycan profiles of milk whey proteins are important in order to better understand the biological functions of milk and to be used both for therapeutic purposes and to determine the type of milk that can replace breast milk. Little is known about glycans, especially their biological properties, which are associated with milk glycoproteins. Therefore, glycosylation analysis of milk whey proteins should be performed with reliable techniques. In this thesis, it is aimed to make N-glycan analysis of 5 different milk types including cow, goat, donkey, buffalo and breast milk. For the analysis of N-glycans, labeling with procainamide was chosen because of its advantage in mass spectrometric devices. In this process, all analyzes were carried out using fluorescence and mass spectrometric detectors based on hydrophilic interaction chromatography. As a result of the analyzes, glycan sequences of each species were determined. For human, cow, goat, buffalo and donkey, 27, 24, 30, 20 and 29 N-glycan structures were determined at MS / MS level, respectively. The relative abundance of N-glycan structures of each species was determined and comparisons were made between the species. Furthermore, glycan structures were grouped according to their common properties and further comparisons were made. H6N2, H4N4F1, H5N4F1, H5N4S1, H5N4F1S1 and H5N4F1S2 glycans were found to be common in all milk. According to the relative abundance of sialylated, N-glycan types containing the most sialic acid were found in goat milk. When it was evaluated in terms of fucose, it was determined that goats milk whey glycomes were highly fucosylated. It was determined that the distribution was followed by human, buffalo, cow and donkey species, respectively. N-glycan structures containing O-acetylated sialic acid were determined only in donkey milk. With this study, glycan analyzes of donkey and buffalo milk were made for the first time and all species were compared for the first time using the same method and device. A strong bioanalytical method has been developed using procainamide labeling and the HILIC-FLD-QTOF-MS/MS method to determine the N-glycan structure of milk proteins.

**Keywords: milk whey protein, N-glycan, mass spectrometry, HILIC, procainamide, glycomics**

## TEŞEKKÜR

Dersini almaya başladığım ilk günden bu yana hiçbir zaman ilgisini ve nezaketini eksik etmeyen, bilimsel kişiliğinin yanısıra kendisine ayrıca hayran olduğum ve her zaman güvenini, desteğini hissettiğim canım hocam Bekir SALİH' e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çok sevgili Mehmet KAYILI hocama sabrı, içtenliği, yardımlarını hiçbir zaman esirgemediği ve bana öğrettikleri için ne kadar teşekkür etsem azdır. Lisansüstü eğitimim boyunca bana öğrettikleriniz, ilginiz ve tüm destekleriniz için minnettarım.

Her zaman yanımda olan, bilgi paylaşımlarının yanısıra yeri geldiğinde dost yeri geldiğinde abi, abla olarak hep destekçim olan, kendilerine imrendiğim çokça da sevdiğim canım hocalarım Ülkü GÜLER'e ve Mehmet ATAKAY'a her şey için çok teşekkür ederim.

Canım Öyküş, zaman iyi ki bizi karşılaştırmış. Tanıdığım için hep şükrettiğim, harika bir çalışma arkadaşı olmanın yanında iyi günümde de kötü günümde de yanımda olduğun için teşekkür ederim.

Aynı çalışma ortamında bir arada olduğumuz ve bir aile haline geldiğimiz SAREG grubunun üyeleri olan çok sevgili arkadaşlarıma paylaşımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Tanıştığım ilk andan itibaren hayatımı değiştiren, dünyamı güzelleştiren ve bana karşı olan desteğini bir an olsun eksik hissetmediğim, yol arkadaşım Halit Metehan DİLAVER' e sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsın.

Daimî destekçim, her koşulda yanımda olan canım aileme tüm emekleri için çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca finansal destek sağlayan Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Post Translasyonel Modifikasyonlar .....	3
2.2 Glikozilasyon .....	4
2.2.1 N-glikanların Sentezlenmesi .....	7
2.2.2 N-glikan Yapıları ve Önemi .....	8
2.3 Süt Whey Proteinleri .....	11
2.3.1 Laktoferrin .....	12
2.3.2 $\beta$ -Laktoglobulin .....	13
2.3.3 $\alpha$ -Laktalbumin .....	13
2.3.4 İmmunoglobulinler .....	13
2.3.5 Lizozim .....	14
2.3.6 Laktoperoksidaz Enzimi .....	14
2.4 N-glikan Profillerinin Belirlenmesi .....	14
2.4.1 Glikanların Kütle Spektrometrisi Analizleri için Örnek Hazırlama Yöntemleri .....	15
2.4.2 Kütle Spektrometrisi .....	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	24
3.1 Kullanılan Kimyasallar .....	24

3.2	Whey Proteinlerinin Ekstraksiyonu ve Deglikozilasyon.....	24
3.3	N-glikanların Prokainamid ile Etiketlenmesi.....	25
3.4	N-glikanların HILIC-SPE Yöntemi ile Zenginleştirilmeleri .....	25
3.5	HPLC-FLD-QTOF-MS/MS Analizleri .....	25
3.6	Veri Analizleri.....	26
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	27
4.1	Anne Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları .....	30
4.2	İnek Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları.....	35
4.3	Keçi Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları .....	39
4.4	Manda Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları .....	44
4.5	Eşek Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları .....	48
4.6	Türler Arası Whey N-glikan tiplerinin Karşılaştırılması.....	53
4.7	Glikozilasyon Gruplarının Karşılaştırılması .....	55
5.	SONUÇLAR .....	59
	KAYNAKLAR.....	61
	ÖZGEÇMİŞ .....	68



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b> Biyolojik işlemlerin düzenlenmesi ile ilgili protein modifikasyonlarının şematik gösterimi [3].....	3
<b>Şekil 2.2</b> N- ve O-bağlı glikozilasyonların şematik gösterimi.....	5
<b>Şekil 2.3</b> A) N-asetil nöraminik asit (Neu5Ac) ve B) N-glikolil nöraminik asit (Neu5Gc) in şematik gösterimi .....	6
<b>Şekil 2.4</b> N-bağlı glikanın yan zincirinin biyosentezinin şematik gösterimi .....	6
<b>Şekil 2.5</b> Sırasıyla kompleks, hibrit ve yüksek mannoz N-glikan yapılarının şematik gösterimi .....	9
<b>Şekil 2.6</b> Sırasıyla 2,3,4 antenli N-glikan yapılarının şematik gösterimi .....	9
<b>Şekil 2.7</b> Laktoferrinin biyolojik rolleri [49].....	12
<b>Şekil 2.8</b> Prokainamid ile etiketlenen glikanın gösterimi .....	17
<b>Şekil 2.9</b> Kütle spektrometrik sistemlerin genel şeması .....	19
<b>Şekil 2.10</b> MALDI ve ESI yöntemlerinin şematik gösterimi .....	20
<b>Şekil 2.11</b> Analizörlerin şematik gösterimi.....	21
<b>Şekil 2.12</b> Glikanların parçalanma bölgelerinin şematik gösterimi .....	23
<b>Şekil 3.1</b> Protein Scape parametreleri .....	26
<b>Şekil 4.1</b> Yöntem akış şeması.....	27
<b>Şekil 4.2</b> Protein Scape yazılımının tespit ettiği bir N-glikan yapısına ait otomatik sekanslanmış bir MS/MS spektrumu .....	28
<b>Şekil 4.3</b> 587,327 m/z parçalanma ürünü içeren N-glikan MS/MS spektrumlarının ekstraksiyonu sonucu elde edilmiş kromatogram .....	30
<b>Şekil 4.4</b> Anne sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları. *: serbest süt oligosakkaritine ait pik .....	31
<b>Şekil 4.5</b> Anne sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları.....	34
<b>Şekil 4.6</b> İnek sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları. *: serbest süt oligosakkaritine ait pik .....	36
<b>Şekil 4.7</b> İnek sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları .....	38
<b>Şekil 4.8</b> Keçi sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları .....	40
<b>Şekil 4.9</b> Keçi sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları .....	42

<b>Şekil 4.10</b> NeuGc içeren N-glikanların MS/MS spektrumları. A) Tek NeuGc içeren iki antenli bir N-glikan, B) hem NeuGc hem de NeuAc içeren bir N-glikan .....	44
<b>Şekil 4.11</b> Manda sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları. *: serbest süt oligosakkaritine ait pik .....	45
<b>Şekil 4.12</b> Manda sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları .....	47
<b>Şekil 4.13</b> Eşek sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları. *: serbest süt oligosakkaritine ait pik .....	49
<b>Şekil 4.14</b> Eşek sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları .....	51
<b>Şekil 4.15</b> O-asetillenmiş siyalik asit içeren iki antenli disiyalile N-glikanın (H5N4S2) MS/MS spektrumu .....	53
<b>Şekil 4.16</b> Türler arası % siyalillenme oranlarının kıyaslanması .....	56
<b>Şekil 4.17</b> Eşek sütünde tespit edilen O-asetillenmiş siyalillenme oranı .....	57
<b>Şekil 4.18</b> Süt türleri arası % fukoatlanma oranlarının kıyaslanması .....	58

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 4.1</b> Spektruma ait parçalanma ürünleri .....	28
<b>Tablo 4.2</b> Anne sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları .....	33
<b>Tablo 4.3</b> Anne sütüne ait toplam fukozlanma ve siyalillenme oranları.....	35
<b>Tablo 4.4</b> İnek sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları .....	37
<b>Tablo 4.5</b> İnek sütüne ait toplam fukozlanma ve siyalillenme oranları .....	39
<b>Tablo 4.6</b> Keçi sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları .....	41
<b>Tablo 4.7</b> Keçi sütüne ait toplam fukozlanma ve siyalillenme oranları .....	43
<b>Tablo 4.8</b> Manda sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları .....	46
<b>Tablo 4.9</b> Manda sütüne ait toplam fukozlanma ve siyalillenme oranları .....	48
<b>Tablo 4.10</b> Eşek sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları .....	50
<b>Tablo 4.11</b> Eşek sütüne ait toplam fukozlanma ve siyalillenme oranları .....	52
<b>Tablo 4.12</b> Süt türlerine göre belirlenen tüm glikanların benzerlik ve farklılıkları .	54

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

<b>M</b>	Kütle
<b>z</b>	Yük sayısı
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>mg</b>	Miligram
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Hz</b>	Hertz

### Kısaltmalar

<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>α-La</b>	α-Laktalbumin
<b>Asn</b>	Asparajin
<b>BPC</b>	Temel Pik Kromatogramı
<b>β-Lg</b>	β-Laktoglobulin
<b>Da</b>	Dalton
<b>dHex, F</b>	Fukoz
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>EIC</b>	Ekstrakte Edilmiş İyon Kromatografisi
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>ESI</b>	Elektrosprey İyonlaştırma
<b>FLD</b>	Floresans Dedektörü

<b>GalNAc</b>	N-Asetil Galaktozamin
<b>GlcNAc</b>	N-Asetil Glikozamin
<b>Hex</b>	Heksoz
<b>HexNAc</b>	N-Asetil Heksoz Amin
<b>HILIC</b>	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
<b>HPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>Igs</b>	İmmunoglobulinler
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LC</b>	Sıvı Kromatografisi
<b>Lf</b>	Laktoferrin
<b>LP</b>	Laktoperoksidaz
<b>Lyz</b>	Lizozim
<b>MALDI</b>	Matriks Yardımlı Lazer Desopsiyon/İyonlaşmalı
<b>MS</b>	Kütle Spektrometrisi
<b>NeuAc</b>	N-Asetil Nöraminik Asit
<b>NeuGc</b>	N-glikolil Nöraminik Asit
<b>PNGase F</b>	N-Glikozidaz F
<b>Proc</b>	Prokainamid
<b>PTM</b>	Post-Translasyonel Modifikasyonlar
<b>Ser</b>	Serin
<b>TFA</b>	Trifloroasetik Asit
<b>Thr</b>	Threonin
<b>QTOF</b>	Dört Kutuplu Uçuş Zamanlı

# 1. GİRİŞ

Glikozilasyon, proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarının en yaygın şekillerinden biridir. Glikotransferaz enzimleri ile sakkaritlerin birbirine bağlanarak proteinlere bağlı glikanlar oluşturması sürecidir ve en yaygın görülen ve en önemli post-translasyonel modifikasyonlardandır. Glikozilasyon sonucu proteinlere eklenen glikanlar immünolojik cevabın modifikasyonu, proteinlerin tanınması, hedeflenmesi ve katlanması gibi önemli rollere sahiptir.

Yapısında karbonhidrat grubu bulduran proteinlere glikoprotein, tek tip veya farklı tip monosakkaritlerin birbirlerine glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşan düz zincirli veya dallanmış yapılara da glikan denilmektedir. Birçok glikoprotein, bir glikozilasyon bölgesinde farklı tiplerde glikan yapısı içerir. Bu çeşitlilik hücre içerisinde glikozilasyon biyosentezi aşamasında oluşur. Glikan yapısının çeşitliliği, peptidin katlanma yapısına ve glikotransferaz enzimleri tarafından tanımlanmalarına göre değişiklik gösterir. Glikan çeşitliliğinin hücre faaliyetlerindeki işlevinin anlaşılması oldukça önemlidir. Glikanlar hücre içi etkileşim mekanizmalarında kritik rol oynamaktadırlar. Özellikle bağışıklık sisteminde, antikörlerin antijenleri tanımlarında kritik işlevlere sahiptirler. Ayrıca glikanlar hücre adhezyonunda, moleküler taşıma süreçlerinde, reseptör aktivasyonunda, sinyal taşımasını ve endositozda önemli görevler üstlenmektedirler.

Glikoproteinlerde en yaygın olarak gözlemlenen glikozilasyon tipi N-glikan formudur. Glikan birimleri anomerik karbonları aracılığıyla asparajin aminoasitinin yan zincirindeki amit azotuna N-glikozidik bağıyla bağlanırlar. Bu yapı endoplazmik retikulum ve golgi aygıtında gerçekleşen bir enzim süreci sonrasında meydana gelir.

Yeni doğanların sağlıklı büyümesi için gerekli olan besleyici bileşenleri içeren karmaşık bir biyolojik matriks olan sütün doğal bir koruyucu fonksiyonu vardır. Sütün antibakteriyel, antimikrobiyal ve bağışıklık sistemine katkıda bulunması gibi önemli fonksiyonları whey proteinlerine atfedilmiştir. Süt proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonları, sadece bileşimlerinin karmaşıklığını genişletmekle kalmamış aynı zamanda onların biyolojik işlevlerine de katkıda bulunmuştur. Sütün

biyolojik işlevlerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve hem tedavi amaçlı kullanılabilmesi hem de anne sütünün yerine ikame edebilecek süt türünün belirlenebilmesi için süt whey proteinlerinin N-glikan profillerinin çıkarılması önemlidir. Ayrıca, sütteki serbest oligosakkaritlerin tipleri ve rolleri hakkında önemli miktarda bilgi mevcut olmasına rağmen, süt glikoproteinleri ile ilişkili glikanlar, özellikle de biyolojik özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle süt whey proteinlerinin glikozilasyon analizlerinin güvenilir tekniklerle yapılması gerekmektedir.

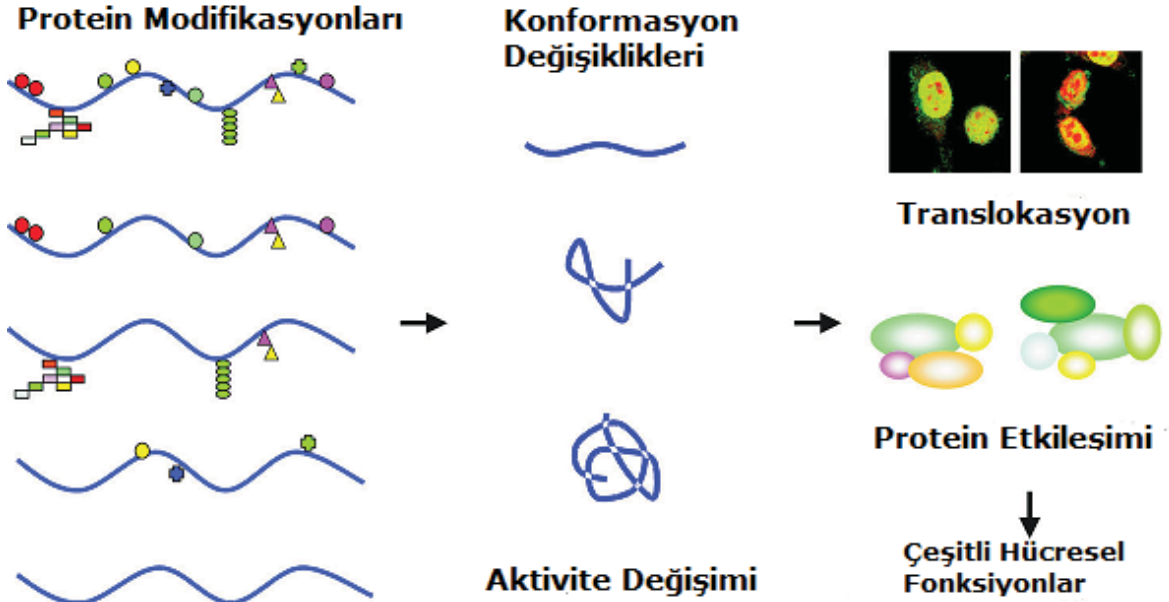
Glikoproteinlerin kütle spektrometrik yöntemlerle yüksek hassasiyette, hızlı ve güvenilir analizleri yapılabilmektedir. Kütle spektrometrik yöntemlerle glikopeptit ve glikan düzeyinde analizler yapılarak, glikoproteinlerin glikozilasyon bölgesinin tanımı, her glikozilasyon bölgesindeki glikan çeşitliliği ve peptit dizilimi hakkında bilgi elde edilir.

Bu tez kapsamında, inek, keçi, eşek, manda ve anne sütü olmak üzere 5 farklı süt tipi kullanılarak bu türlerin N-glikan analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. N-glikanların analizleri için kütle spektrometrik cihazlarda sağladığı avantaj nedeniyle prokainamid ile etiketleme metodu seçilmiştir. Bu süreçte tüm analizler hidrofilik etkileşim kromatografisi temelinde floresans ve kütle spektrometrik dedektörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucu her bir türe ait glikan dizilimleri belirlenmiştir. Her bir türe ait N-glikan yapılarının göreceli bollukları belirlenerek türler arasında kıyaslamalar yapılmıştır. Ayrıca, glikan yapıları ortak özelliklerine göre gruplandırılarak ilave karşılaştırmalar yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Post Translasyonel Modifikasyonlar

Post-translasyonel modifikasyonlar (PTM), protein yapılarında meydana gelen kimyasal değişikliklerdir. Genellikle substrata özgü özgün enzimler tarafından katalizlenirler. PTM'lar bir aminoasit kalıntısının bir veya daha fazlasına bir kimyasal grubun veya başka bir proteinin eklenmesiyle proteinin özelliklerini değiştirirler. Hücre içi mevcut olan çeşitli düzenleme mekanizmalarından PTM'lar, yüksek oranda dinamik ve geri dönüşümlü reaksiyonlardır [1]. Şu anda bilinen 300'den fazla post-translasyonel modifikasyon bulunmaktadır ve her geçen gün yenisi keşfedilmektedir [2]. İnsan genom projesinden elde edilen bir proteinin birincil yapısı, proteinin çeşitli biyolojik fonksiyonlarını ve bunların düzenleme mekanizmalarını açıklamak için yeterli olmamıştır. Proteinlerin hücrel homeostatik modifikasyonlarının çeşitli hücrel işlemleri başlattığı gösterilmiştir. Bu modifikasyonlar tek başlarına veya çeşitli kombinasyonlarda zamana ve sinyale bağlı olarak gerçekleşir [3].



**Şekil 2.1** Biyolojik işlemlerin düzenlenmesi ile ilgili protein modifikasyonlarının şematik gösterimi [3]

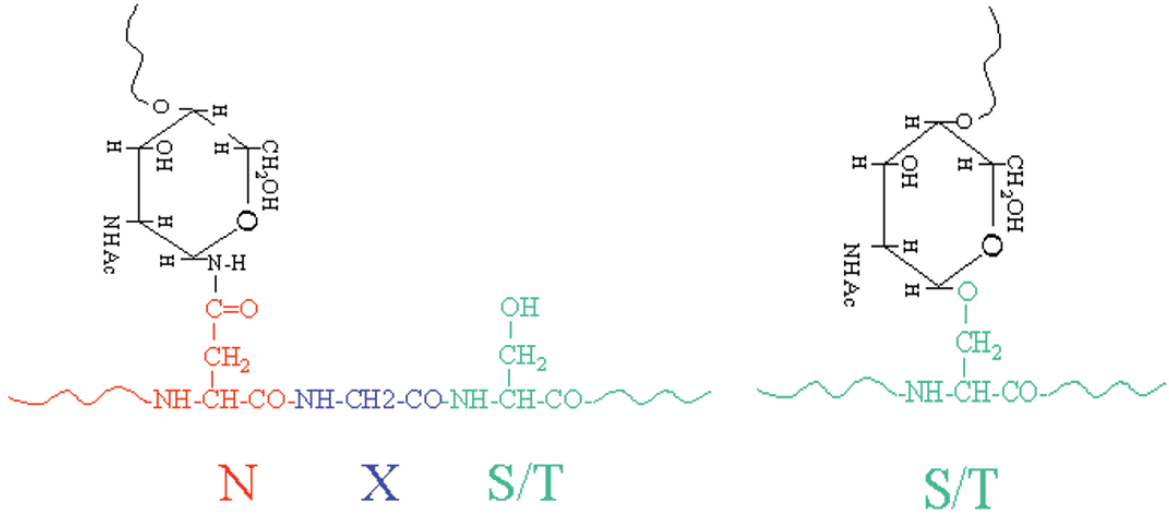
Proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları, protein aktivite durumlarını, hücrel konumunu ve diğer proteinlerle olan dinamik etkileşimlerinde



değişikliklere neden olarak protein fonksiyonlarını düzenleyebilmektedir. Memeli hücrelerin nerdeyse % 80 inin post translasyonel modifikasyona uğradığı söylenilmektedir [4]. Bu modifikasyonlardan en yaygın ve en çok üzerinde çalışılanları fosforilasyon, übikitinasyon, asetilasyon ve glikozilasyon olarak söylenebilir. Glikozilasyon proteinin katlanması, stabilitesi ve lokalizasyonu dahil olmak üzere birçok biyokimyasal işlemde rol oynar [5].

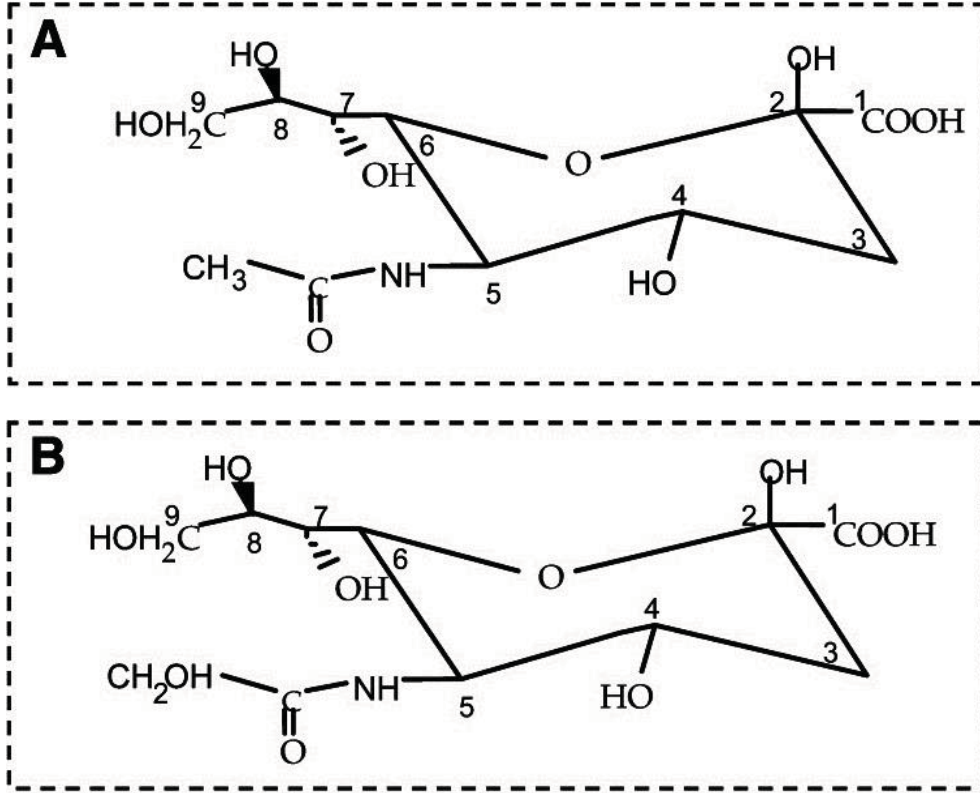
## 2.2 Glikozilasyon

Glikozilasyon, ökaryotik proteinlerde en yaygın post translasyonel modifikasyon formlarından biridir. Sakkaritlerin enzimler aracılığıyla birbirine bağlanarak proteinlere veya diğer organik moleküllere bağlı glikanlar oluşturma sürecidir. Glikanlar, hücrelerin dört temel bileşeninden biridir ve ayrıca doğanın biyopolimerlerinin en bol ve çeşitli olanları olabilir. Genellikle proteinlere ve lipitlere bağlanmış sakkaritlerin kovalent bağları olarak mevcut olan glikanlar, biyolojik sistemlerdeki kütle ve yapısal çeşitliliğinin önemli bir miktarını oluşturur. Glikobiyoji alanı, glikanların ve bunların türevlerinin yapısını, kimyasını, biosentezini ve biyolojik fonksiyonlarını anlamaya odaklanır [6]. Glikozilasyon, doğal ve biyofarmasötik proteinlerde bulunan en yaygın PTM'yi temsil etmektedir. İnsan proteinlerinin % 50'den fazlası glikozile olmaktadır [7]. Glikozilasyon, proteinlerin lokalizasyonunu, aktivitesini ve fonksiyonunu belirler ve böylece çeşitli hücresel işlemlerin kontrolünde önemli roller oynar. Yapılan çeşitli çalışmalar, glikozilasyonda meydana gelen anormal değişikliklerin, bağışıklık yetersizliği, kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve konjenital bozukluklar gibi memeli hastalıkları üzerinde çok önemli etkileri olduğunu göstermiştir [8]–[11]. Glikozilasyon, sakkaritlerin bağlanma motifine göre ikiye ayrılmaktadır. Sakkaritlerin serin veya threonin aminoasitlerine glikozidik bağlarla bağlanması O-glikozilasyon, özgün olarak asparajine glikozidik bağlarla bağlanması ise N-bağlı glikozilasyon olarak adlandırılmaktadır. İnsan genomunun %1-2'si, N veya O bağlantılı glikozilasyona katkıda bulunan proteinleri kodlamaktadır [12].



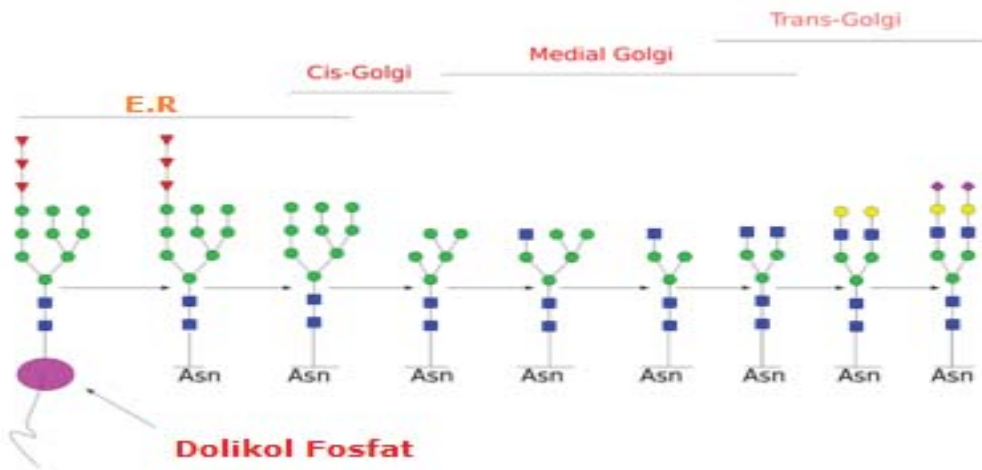
**Şekil 2.2** N- ve O-bağlı glikozilasyonların şematik gösterimi

Glikanlar başlıca N-asetil glikozamin (GlcNAc), N-asetil galaktozamin (GalNAc), glikoz, galaktoz, N-asetil nöraminik asit (NeuAc), mannoz ve fukoz olmak üzere 7 monosakkarit biriminden oluşur. Glikoproteine bağlanan bu monosakkaritlerin bağlanmasındaki ve dizilimindeki farklılıklar mikro çeşitlilik oluşturmaktadır. Bu çeşitlilik, proteinin glikozilasyonu sırasında hücre içerisinde gerçekleşir. Protein glikozilasyonu, proteinlerin uygun şekilde katlanmasına, kararlılığına ve immün sistem hücrelerinin sıklıkla ihtiyaç duyduğu hücreden hücreye yapışmasına yardımcı olur. Glikozilasyon sırasında eklenen büyük karbonhidrat yapıları, immünojenik peptit epitoplarını immün sistem tarafından tanınmasından koruyabilir. Bununla birlikte, yüksek mannoz N-glikanlar veya N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc) ve galaktoz-a1,3-galaktoz (a-Gal) gibi insan veya memelilerde olmayan glikanlar, immün reaksiyonlara neden olabilir [13]. Neu5Gc'yi oluşturmak üzere Neu5Ac'nin hidroksilasyonundan sorumlu olan CMP-Neu5Ac hidroksilaz genindeki bir ekzon eksikliği veya çerçeve kayması mutasyonu nedeniyle sağlıklı insanlarda bulunmaz. Bu mutasyon, bütün insan dokularında Neu5Gc ekspresyonunun toplam yokluğuyla sonuçlanmıştır [14]. Neu5Gc, insan kansinomlarında, fetal dokuda ve cerrahi veya otopsi işlemleri sonrası incelenen insan örneklerinin epitel ve endoteli dahil normal doku tiplerinde düşük seviyelerde tespit edilmiş ve bu dokulardaki Neu5Gc'nin kırmızı et ve süt ürünleri bakımından zengin bir diyet yemekten elde edildiği gösterilmiştir [14]–[16].



**Şekil 2.3** A) N-asetil nöraminik asit (Neu5Ac) ve B) N-glikolil nöraminik asit (Neu5Gc) in şematik gösterimi

Vücuttaki başlıca protein glikozilasyon bölgeleri ER, Golgi gövdesi, çekirdek ve hücre sıvısıdır. Glikoprotein Golgi'yi geçerken değişken (dış kol) şekerlerinin eklenmesi yoluyla önemli bir heterojenite sağlamaktadır. (Şekil 2.4)



**Şekil 2.4** N-bağlı glikanın yan zincirinin biyosentezinin şematik gösterimi

Ortaya çıkan çeşitli glikoformların varlığı ve doğası, glikoprotein katlanmasını, kararlılığını, immunojenitesini ve ayrıca birincil fonksiyonel aktivitesini etkileyebilir [17], [18]. Bir glikoprotein glikoform profili ve fonksiyonel aktivitesi, aynı organizmada ifade edildiği dokuya bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Proteinlerin tanımlanması ve ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi yanısıra, translasyon sonrası modifikasyonların (PTM) analizi proteomik çalışmalarında giderek daha önemli bir özellik haline gelmektedir. Vücut sıvılarında bulunan proteinlerin çoğu (serum, beyin omurilik sıvısı, idrar, süt, tükürük gibi) glikozile edilir [19]. Bu proteinler ayrıca tanısal ve terapötik amaçlar için en kolay erişilebilir örneklerdir. Bu nedenle, birçok klinik biyobelirteç ve tedavi hedefinin glikoprotein olması şaşırtıcı değildir. Hastalıkla ilişkili glikozilasyon değişimi sorununu ele almak için, proteinlerin glikozilasyonunun analizi için hassas ve hızlı stratejiler gerekmektedir. Protein tanımlaması, glikozilasyon bölgelerinin yeri ve glikan heterojenitesinin değerlendirilmesi, glikoproteomikte ele alınan temel yapısal konulardır. Modern ayırma metodolojileriyle birlikte kütle spektrometrisi, glikanların ve glikopeptitlerin yapısal analizi için güçlü ve çok yönlü tekniklerden biri haline gelmiştir. Kütle spektrometrisi, düşük numune miktarına ihtiyaç duyması ve yüksek hassasiyet gibi özellikleriyle geleneksel analitik yöntemlere göre birçok avantaj sağlamaktadır. Böylelikle kütle spektrometrisi hızlı ve güvenilir glikomik ve glikoproteomik analizleri için anahtar teknoloji haline gelmektedir [20].

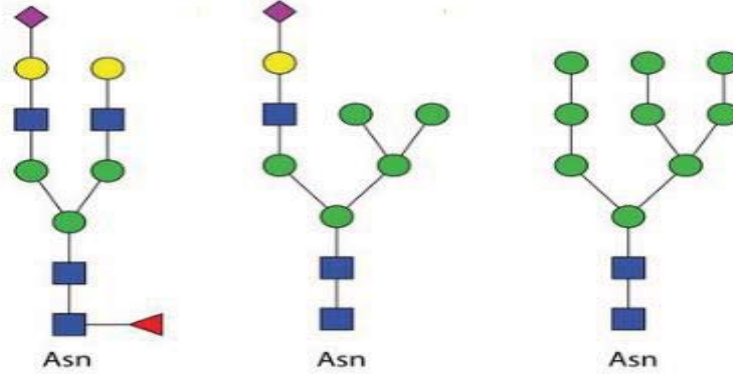
### **2.2.1 N-glikanların Sentezlenmesi**

Glikozilasyon, ökaryotik hücrelerde, farmakokinetik, farmakodinamik ve immünojeniklik gibi biyolojik olarak ilgili birtakım fonksiyonları etkileyen bir post-translasyonel modifikasyondur. Glikozile edilmiş proteinler, asparajin yan zincirlerinde azota N-bağlı veya serin veya treonin içindeki oksijene O-bağlı karbonhidratlar içerir. Endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi aygıtı boyunca geçiş sırasında, N-bağlı glikanlar üç aşamalı bir işlemde tutturulurlar. Öncü oligosakkaritler sentezlenir, daha sonra aktifleştirilmiş bir polimer blok olarak asparajinlere aktarılır ve son olarak enzimatik olarak kesilir. Asparajin'e N-bağlı glikozilasyon, X'in prolin hariç herhangi bir amino asit olabileceği asparajin-X-serin-treonin (Asn-X-Ser / Thr) 'nin tanıma motifini gerektirir. O-bağlı glikozilasyon, bir konsensüs sekansı gerektirmez, fakat daha çok Ser veya Thr'nin ikincil yapısı ve erişilebilirliğine dayanır. Ayrıca, O-bağlantılı şekerler Golgi'de sıralı olarak tekli

monosakkaritler halinde eklenir. Glikoziltransferazlar tarafından sonradan yapılan değişiklik, olgun O-glikan ile sonuçlanır. O-bağlı oligosakkaritlerdeki uç şeker tipik olarak siyalik asittir. Birkaç siyalik asit çeşidi vardır, ancak yalnızca N-asetilnöraminik asit (NeuAc) yarı ömür üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. N- veya O-bağlı glikanların son yapısının protein sekansı ile ilgili olmadığını, ancak bunun yerine üç boyutlu yapının yanı sıra gerekli enzimlerin ekspresyonu ve ER ve Golgi'deki şeker substratlarının mevcudiyetine bağlıdır.

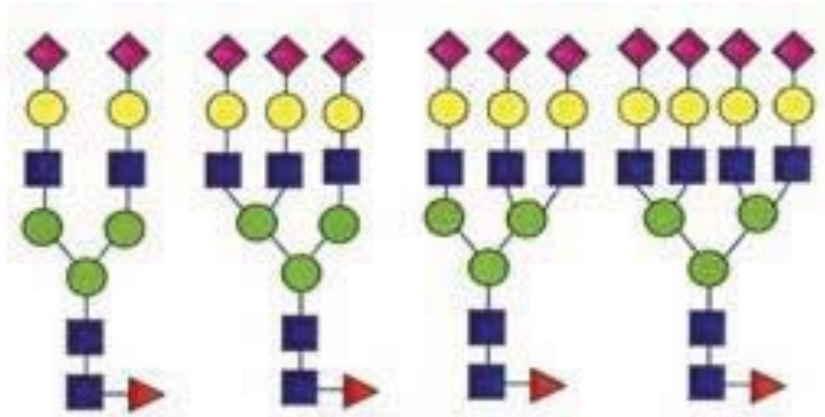
### **2.2.2 N-glikan Yapıları ve Önemi**

N-glikanların sentezi bir asparajin amino asidine başlatıcı oligosakkarit olan 14 öncü şekerin eklenmesiyle hücre içerisinde ER'de başlar. Burada çeşitli glikozidaz ve glikoziltransferaz enzimleri aracılığıyla bu öncü şeker üzerindeki bazı birimler yapıdan uzaklaştırılır. N-glikanlar için yapının olgunlaşması golgide gerçekleşir. Çekirdek glikan yapısı esas olarak iki N-asetil glukozamin ve üç mannoz kalıntısından oluşur. Bu çekirdek glikan daha sonra ayrıntılı bir şekilde geliştirilir ve modifiye edilir, bu da çeşitli N-glikan yapılarına neden olur. Sentez sonrası, N-glikanlar, yapısında 5 monosakkarit biriminin bulunduğu kendine özgü bir çekirdek yapıya sahip hale gelir. Bu yapıdaki ilk birim olan N-asetil glukozamin asparajine özgün bir tripeptit sekansı ile bağlanarak N-glikan yapısını oluşturur. Buradaki sekans Asn-Xxx-Ser/Thr şeklinde olup, Xxx pirolin hariç herhangi bir aminoasit olabilir. N-glikanlar, hibrit, yüksek mannoz ve kompleks yapıları olmak üzere 3 kategoriye ayrılmaktadır.



**Şekil 2.5** Sırasıyla kompleks, hibrit ve yüksek mannoz N-glikan yapılarının şematik gösterimi

İki veya daha fazla dallanmış yapıda olup, her bir dallanma bölgesinde en az bir galaktoz, N-asetil glikozamin, siyalik asit veya N-glikozil nöraminik asit içeren formlar ise kompleks yapılı N-glikanlar olarak adlandırılırlar. Bu yapılardaki dallanma sayısına göre de bir, iki, üç antenli olarak belirtilirler (Şekil 2.5). Hibrit yapıdaki N-glikanlarda ise dallanmış bir bölgesi yüksek mannoz yapıdaki N-glikanlardan oluşurken diğer bölgesi kompleks yapıdaki N-glikanlardan oluşmaktadır. Şekil 2.5'te görüldüğü üzere yüksek mannoz yapıdaki glikanlar, çekirdek yapısındakiler hariç 2'den fazla 6'ya kadar farklı sayılarda mannoz birimleri içermektedir.



**Şekil 2.6** Sırasıyla 2,3,4 antenli N-glikan yapılarının şematik gösterimi

Glikoproteinlerdeki glikan zincirleri embriyonik gelişim, hormonların ve toksinlerin tanınması ve hücreden hücreye etkileşimler dahil biyolojik işlemlerde anahtar rol oynar. Hücreler arası ve hücre içi aktiviteler [21], bağışıklık fonksiyonlarının koordinasyonu [22], hücre bölünmesi işlemleri ve protein düzenlemeleri ve etkileşimleri gibi birçok biyolojik işleme katılmaktadır. Bazı glikokonjugatlar, hücre yüzeyinde çeşitli moleküllerin reseptörleri olarak görev yapar. Glikanlar, glikoproteinlerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde de çok önemli bir etkiye sahip olabilir. Bu proteinlerin proteaz aktivitesi ile parçalanma eğilimi, çözünürlüğü, birikimi ve eğilimi, glikan zincirlerinin varlığı veya yokluğundan etkilenebilir. Kararlılığı veya ısıl kararlılığı korumak için bunlara ihtiyaç duyulabilir [23]. Glikanlar, fertilizasyon gibi tanıma fenomenlerinde ligandlar olarak gösterilmiştir [24]. Glikanlar protein katlanmasında, hücre hücre etkileşiminde, bağışıklık sisteminde ve hücre farklılaşması, kanser metastazı gibi birçok hücresel süreçte önemli rol oynamaktadırlar ve meydana gelen değişiklikler, çeşitli hastalıklar ve kanser ile ilişkilendirilmiştir [25], [26]. Bu sebeple proteinler ve lipidler üzerindeki en yaygın post translasyonel modifikasyonlardan biri olan glikanlar, hastalık biyobelirteçleri ve tedavi hedefleri olarak büyük bir potansiyele sahiptirler [27].

### 2.3 Süt Whey Proteinleri

Süt, yenidoğan memelinin sağlıklı büyümesi için gerekli temel besleyici bileşenleri içeren kompleks bir biyolojik matrikstir. Süt içerisinde bulunan proteinler, memeli sütündeki hayati bir bileşendir ve yenidoğan için zengin bir temel aminoasit kaynağı olarak tanımlanmıştır.

Sütteki koruyucu faktörlerin varlığı, 100 yıldan daha uzun süredir bilinmekteydi fakat son zamanlarda artan çalışmalarla birlikte önemi şu anda daha iyi bir şekilde ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalar süt oligosakkaritlerinin ve glikoproteinlerinin bebeklerin patojenlerden korunmasında rol oynadığını göstermiştir [28]–[30]. Aslında, insan ve sığır sütündeki son proteomik çalışmalar, süt proteinlerinin yoğun şekilde glikozile edildiğini göstermiştir [31], [32]. İlk tahminler, insan proteinlerinin %70'inden fazlasının glikozile edilebileceğini göstermiştir [33], [34]. Sütün doğal bir koruyucu işlevi vardır: enfeksiyona karşı direnci artırabilir ve potansiyel olarak patojenik mikroorganizmaların etkisini engelleyebilir. Sütteki antimikrobiyal aktivite temel olarak whey proteinlerinden küçük miktarda bulunan laktoferrin (Lf), lizozim (Lyz), immünoglobulinler (Igs) ve laktoperoksidaz (LP) a atfedilir.

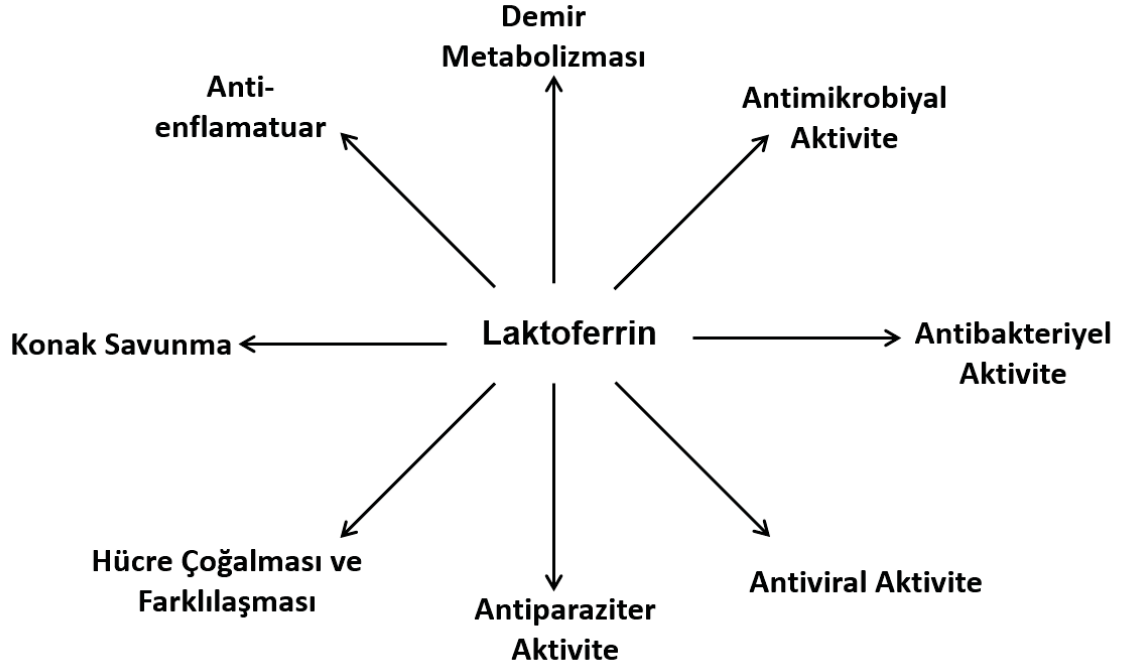
Yapılan son çalışmalarda eşek sütünün, sağlıklı yaşlı tüketicilerde immün yanıtın düzenlenmesinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir [35]. Buna ek olarak antimikrobiyal aktivitesi test edilmiş ve sıklıkla bağırsak enfeksiyonu ile ilişkili bakteri ve virüslere karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır [36]–[39]. Bazı araştırmalar, eşek sütünde birlikte çalışan Lyz, Lf ve Igs'in, sindirim kanalında mikrobiyal büyümeyi engelleme potansiyeli olan ve özellikle bebeklik döneminde ve çocukluk çağındaki gastrointestinal enfeksiyonların görülme sıklığını azaltmaya katkıda bulunan bir sinerji yarattığını göstermektedir. Özgün olarak, oligosakkaritler ve glikokonjugatlar (glikolipitler, müsin ve glikoproteinler) insan vücudunu mikroplara, virüslere ve toksinlere karşı korumaktadır [40], [41]. Özellikle insan sütünde bol miktarda bulunan demir bağlayıcı glikoprotein olan laktoferrinin antiviral ve antimikrobiyal aktiviteler sergilediği gösterilmiştir [42], [43]. Birçok klinik çalışma, at sütü ve özellikle eşek sütünün, inek sütü protein alerjisinde, diyet yeterliliği ve iyi lezzetlilik sağlayarak güvenli ve alternatif bir yiyeceği temsil edebileceğini göstermiştir [44], [45]. Aslında, sığır sütüne alerjisi olan deneklerin yaklaşık %80'inin eşek sütüne alerji göstermediği gösterilmiştir [46].



### 2.3.1 Laktoferrin

Laktotferrin, ilk kez 1939'da Sorensen ve Sorensen tarafından sığır sütünden izole edilen ve daha sonra 1960'ta Johanson tarafından insan sütünden tanımlanmış, yüksek oranda glikozile edilmiş en önemli glikoproteinlerden birisidir. Demir bağlama, antioksidan, anti bakteriyel ve antiviral aktiviteler de dahil olmak üzere bir dizi biyokimyasal özellik sunmaktadır [47].

692 aminoasitten oluşan, yaklaşık 76 kDa molekül ağırlığına sahip olan laktotferrin aynı zamanda laktotransferrin olarak da bilinir. Demir iyonlarını bağlama ve aktarma kabiliyetine sahip transferrin ailesinin bir üyesidir. Laktoferrine bağlı glikanlar, diğer transferrinlere bağlı olanlardan daha karmaşık ve daha heterojendir. Glikanların heterojenliğinin ve karmaşıklığının laktotferrinlerin ilgili biyolojik özelliklerinde farklılıkların en azından bir kısmının temeli olduğuna inanılmaktadır [48].



Şekil 2.7 Laktoferrinin biyolojik rolleri [49]

Laktotferrin yüksek miktarlarda süt, tükürük, gözyaşı, mukus, beyaz kan hücreleri, seminal sıvı gibi memeli ekzokrin sekresyonlarında bulunur [50], [51]. Sütteki laktotferrin içeriği ise memeli türlerine ve laktasyon aşamasına bağlı olarak

değişmektedir [52]. Süt whey proteinleri içerisinde en bol ikinci proteindir. Laktoferrinin ağız yolundan verilmesi insanlarda ve hayvanlarda, anti-kanser, anti-enflamatuvar ve anti-enfektif aktivitelerde dahil olmak üzere çeşitli faydalı sağlık etkileri gösterdiği ileri sürülmüştür [53]–[55]. Ayrıca laktoferrin, lipid oksidasyonunun önlenmesi ve mikrofloranın iyileştirilmesinde kullanılmaktadır [56], [57].

Sahip olduğu antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı laktoferrin, gıda endüstrisinde birçok uygulamaya sahiptir. Örneğin, sığır sütü laktoferrini, kekler, hamur işleri, yoğurtlar ve içecekler gibi gıda ürünlerini ve kozmetik gibi gıda dışı ürünleri desteklemek için kullanılır. Laktoferrin ile güçlendirilmiş gıdalar ve özellikle bebek formülleri geliştirmek için, günlük süttten elde edilen doğal bir laktoferrin kaynağı kullanılır. Uygun bir bebek maması tasarımı, insan sütü laktoferrinin özelliklerini taklit eden ve yenidoğanların bağışıklık tepkilerini geliştiren laktoferrin eklenmesini gerektirir [49].

### **2.3.2 $\beta$ -Laktoglobulin**

$\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -Lg), insan, deve ve kemirgen sütü hariç en yoğun whey proteindir. Birkaç biyolojik rol oynadığına inanılan molekül ağırlığı yaklaşık 18 kg/mol olan küresel bir çözünen proteindir [58]. İnsan sütünde bulunmayan  $\beta$ -Lg'ün, genel olarak, inek sütü proteini alerjisinin [59] ana nedenlerinden biri olan kazein fraksiyonu ile birlikte, hassas konularda alerjik bir reaksiyon ortaya çıkarabildiği kabul edilmektedir [60].

### **2.3.3 $\alpha$ -Laktalbumin**

Molekül ağırlığı yaklaşık 14 kDa olan, küçük globüler bir kalsiyum metaloproteindir. Eşek  $\alpha$ -La'ni, gastrik ve duodenal enzimlere karşı dirençlidir, çünkü %95'i iki aşamalı bir in vitro testten sonra sindirilemez, böylece çiğ at, inek ve insan sütü için rapor edildiği gibi nispeten sağlam bir şekilde bağırsaklara ulaşır [61], [62].

### **2.3.4 İmmunoglobulinler**

Sütteki immünoglobulinler, yenidoğan için bağırsak mukozasını patojenik mikroorganizmalara karşı doğal olarak koruyan önemli bir savunma ailesidir.

Bakteriyel yüzey üzerindeki özgün bölgelere bağlanarak bakterileri etkisiz hale getirirler: rolleri, kendi bağışıklık sistemi gelişirken yenidoğan için pasif bağışıklık kazandırmaktır [63]. İnsanlarda, IgG rahim içinde fetusa transfer edilirken eşeklerde, IgG'ler sadece kolostrum ve ardından olgun süt ile doğumdan sonra sağlanmıştır. Bu sebepten, eşek sütü, insan ve sığır sütlerine kıyasla bu protein fraksiyonunun daha yüksek içeriğine sahiptir [60]. Genel olarak, kolostrumda ve olgun sütteki yüksek miktarda immunoglobulinler, mikrobiyal büyümeyi inhibe eder ve yenidoğanın immünitesine katkıda bulunur. Bu özellik genellikle sağlığa yararlı etkileri belirli bir süt türüne atfetmek veya çiğ süt tüketmek için bir argüman olarak kullanılır [64]. Süt Ig'leri doğal immün sistemi kontrol eder; ayrıca, alınan sığır IgG ve IgM'sinin yaklaşık %19'unun sağlıklı insan yetişkinlerin ileumunda immünolojik aktivitesini koruduğu bulunmuş, böylece antimikrobiyal etkilerini doğrudan bağırsakta, laktoferrin ve lizozimle birlikte de uyguladıklarına inanılır [65].

### **2.3.5 Lizozim**

Lizozim doğal bir koruyucu işlevi görür ve çiğ eşek sütüne uzun raf ömrü kazandırmaktadır [38], [47]. Bağırsak immün yanıtında önemli rol oynayan güçlü bir antibakteriyel proteindir [66], [67]. Eşek sütünün lizozimi sindirime karşı dayanıklıdır. Toplam proteinin sadece %25'i gastrointestinal su ile in-vitro olarak sindirilir [62]. Aynı zamanda, 30 dakika boyunca 63 °C'lık bir ısısal işlemde sonra bile ısısal kararlı kalabilmektedir [68]–[70].

### **2.3.6 Laktoperoksidaz Enzimi**

Laktoperoksidaz (LP), mikroorganizma enfeksiyonlarına karşı koruyucu işlevi olan bir oksidoredüktaz enzimidir. Enzim, bir heme grubu, karbonhidratlar ve bir kalsiyum iyonu içerir. LP, sığır kolostrumunda en büyük bir antibakteriyel maddedir [71].

## **2.4 N-glikan Profillerinin Belirlenmesi**

Son on yılda, büyük ilgi gören bir biyoaktif biyolojik akışkan olarak kalmaya devam eden süt proteomik çalışmalarını (özellikle insan ve sığır) incelemek için büyük çabalar ele alınmıştır. Süt bileşenlerinin karmaşıklığı ve çokluğu nedeniyle, bu karmaşıklığı ele alan çok yönlü bir tablo elde etmek için genetik yönleri, moleküler

yolakları ve süt üretiminde, kalitesinde ve güvenliğinde yer alan hücresel fonksiyonları keşfetmek için farklı araştırma teknikleri birleştirilmiştir. Yüksek verimli teknolojilerin hızlı gelişimi, sütte DNA, RNA ve protein seviyeleri hakkında büyük ölçekli veri üretilmesine izin verir. Protein glikozilasyonu, hücre biyolojisi ve hastalıklarındaki kritik rolü nedeniyle artan ilgi görmüştür. Fenotip bağımlı glikozilasyonu ayırt etmek için yeni metodolojiler geliştirmek, sadece hücre sinyalleşme yollarının mekanik yönlerini açıklamakla kalmayacak, aynı zamanda hastalık teşhisi veya prognozu için biyolojik belirteç keşfini de hızlandıracaktır.

#### **2.4.1 Glikanların Kütle Spektrometrisi Analizleri için Örnek Hazırlama Yöntemleri**

Kütle spektrometrisi kullanılarak yapılan analizlerde glikoproteinler iki düzeyde incelenmektedir. Glikopeptit düzeyi, glikoproteinin herhangi bir proteaz kullanılarak peptitlerine indirgenmesi ve bu peptitlerin analizine dayanır. Glikan düzeyi ise glikoproteinlerin özgün glikozidaz enzimleri aracılığıyla, glikozilasyon bölgesinden glikanların ayrılması ve bu glikanların saflaştırılarak analiz edilmesi esasına dayanır. Glikan düzeyinde yapılan bir analizde yapıya özgü glikanların bilgisi elde edilir. Glikozilasyon bölgesi ve peptit dizilimi gibi bilgileri edinebilmek için glikopeptit düzeyindeki analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Hem glikopeptit düzeyindeki analizler hem de glikan düzeyindeki analizler elde edilen bilgiler ışığında birbirini tamamlayıcı rol üstlenirler. Her iki düzeydeki analizler çeşitli kütle spektrometri cihazları ve kombinasyonlarıyla gerçekleştirilebilmektedir. Kütle spektrometrisi ile gerçekleştirilen glikan analizlerde kullanılan çok sayıda etiketleme, türevlendirme ve zenginleştirme gibi çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Burada gerçekleştirilen bu yöntemler hakkında bilgi verilecektir.

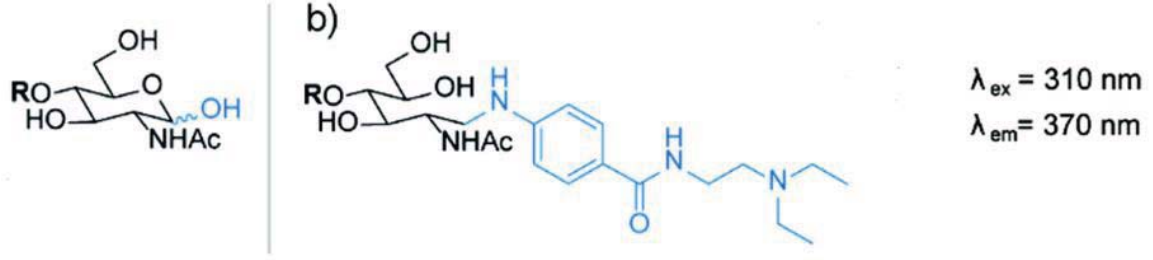
##### **2.4.1.1 Glikanların Salınımı (Deglikozilasyon)**

Deglikozilasyon, enzimatik veya kimyasal bazlı teknikler kullanılarak şekerlerin peptidden salınımıdır. İki yöntemin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. N-glikanlara özgü çeşitli enzimler bulunmaktadır. Endoglikozidaz enzimlerinden en popüler olan PNGase F enzimi (35kDa) aracılığıyla, glikanların proteinden herhangi bir bozunmaya uğramadan salınımı gerçekleşir. Kullanılan bu enzim, asparajin aminoasiti ile N-glikanların çekirdek yapısında bulunan N-

asetilglukozaminin arasındaki bağı kırarak glikanların proteinden ayrılmasını sağlar. Proteinin N-bağlı bölgesinde asparajin yerine aspartik asit kalır.

#### **2.4.1.2 Glikanların İndirgeyici Uçlarından Etiketlenmesi**

Protein N-bağlı glikozilasyonun evrensel önemine dair artan farkındalık, N-glikan analizinde daha ileri tekniklerin gelişmesini gerektirmektedir. Günümüzde, birçok fizyolojik işlemdeki önemli rolünden kaynaklanan doğru protein fonksiyonu için doğru glikozilasyonun belirlenmesinin gerekli olduğu iyi bilinmektedir. Ayrıca, glikozilasyon, çoklu yaygın kompleks hastalıkların patofizyolojisinde rol oynar [72]. Çalışmaların çoğunda, N-bağlı glikozilasyon profilleri, analizin hassasiyetini arttırmak için daha fazla türevlendirilebilen enzimatik olarak salınan glikanlardan analiz edilir. Çünkü serbest glikanlar kromofor veya florofor özellikleri içermediğinden ve de kütle spektrometrik iyonlaştırılmaları iyi olmadığından, genellikle ayrılma veya tespitini kolaylaştırmak ve analizin hassasiyetini arttırmak için türevlendirilirler. Bu türetilmiş N-glikanlar, en yaygın olarak sıvı kromatografi (LC), kütle spektrometrisi (MS) veya her ikisinin bir kombinasyonu kullanılarak profilleri belirlenmektedir. Türetilmiş N-glikanların, hidrofilik etkileşim kromatografisi, floresans ve kütle spektrometrisinin birlikte kullanılarak profillerinin belirlendiği teknikler yüksek verimli bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Bazı floresan etiketler, iyonlaşma verimliliğini artırabilir ve bu da MS tespitini kolaylaştırır. En sık kullanılan etiketleme bileşiklerinden biri, indirgeyici bir aminasyon reaksiyonu ile glikana bağlanan 2-aminobenzamid (2-AB) 'dir. 2-AB'nin dezavantajı, MS analizini engelleyen zayıf iyonlaşma verimliliğidir. Prokainamid (4-amino-N- [2- (dietilamino) etil] benzamid; proc), bir glikanın indirgen ucuna bağlanmak için 2-AB ile aynı mekanizmayı kullanan başka bir floresan etiketidir, ancak artmış floresans ve iyonlaşma performansı gösterir [73], [74]. Bu, proc'un yüksek proton afinitesine sahip bazik bir tersiyer amin kuyruğu içermesi, dolayısıyla pozitif mod ESI-MS'de daha yüksek hassasiyet göstermesi ile açıklanabilir. Proc'un bu özellikleri sayesinde HPLC-HILIC-FLD-QTOF-MS/MS analizleri daha verimli olmaktadır.



**Şekil 2.8** Prokainamid ile etiketlenen glikanın gösterimi

### 2.4.1.3 Glikanların Zenginleştirilmesi

Kütle spektrometrisi, yüksek kütle doğruluğu, hassasiyet, düşük numune miktarı ve kısa sürede analiz edebilme özelliklerine sahip olması nedeniyle glikomikte önemli bir araç haline gelmiştir. Bununla birlikte, kütle spektrometrik tekniklerde önemli gelişmeler olmasına rağmen, glikanların zayıf iyonlaşma verimliliğine ek olarak biyolojik numunelerde glikoproteinlerin düşük bolluğu nedeniyle daha güçlü gliko-analitik yöntemlere ihtiyaç duyulur. Bu nedenle, kütle spektrometrik analizlerden önce glikanların zenginleştirilmesi ve saflaştırılması gerekir. Şimdiye kadar hidrofilik, lektin bazlı, grafitli karbon bazlı, şelasyon ve kovalent bağ oluşumu dahil olmak üzere çeşitli etkileşim tekniklerine dayanan çeşitli zenginleştirme yöntemleri geliştirilmiştir. Hidrofilik etkileşime dayalı yöntemler, glikokonjugatların geniş aralıktaki hidrosil taşıyan katı fazlara afinitesine bağlı olarak glikoproteomik çalışmalarında en sık kullanılan tekniklerden biri olmuştur.

Doğal ürünlerin, glikopeptitlerin zenginleştirilmesi için alternatif materyal olarak kullanılması, birkaç çalışmada uygulanmıştır. Bu tip gliko-analitik yöntemler, bir materyali sentezlemek için herhangi bir protokol olmadan bir peptid havuzundan glikopeptitlerin zenginleştirilmesi için daha basit, tekrarlanabilir ve ucuz işlemler sağlar.

Glikanlar hidrofobik özellikteki glikozile edilmemiş peptidlerden HILIC ile ayrılır. Zwitter-iyonik (ZIC), amid bazlı (TSKgel Amide-80) ve karbonhidrat bazlı HILIC malzemeleri (pamuk, sepharose, selüloz) gibi çeşitli HILIC materyalleri glikan zenginleştirme için kullanılmıştır. Pamuk gibi karbonhidrat bazlı malzemelerde glikanların tutulması, temel olarak hidrojen bağlanmasına dayanır. Pipet ucuna

yerleştirilerek kullanılan pamuk bazlı HILIC malzemelerinin hazırlanması çok kolay ve ucuzdur ve aynı zamanda hızlı akış sağlamaktadır.

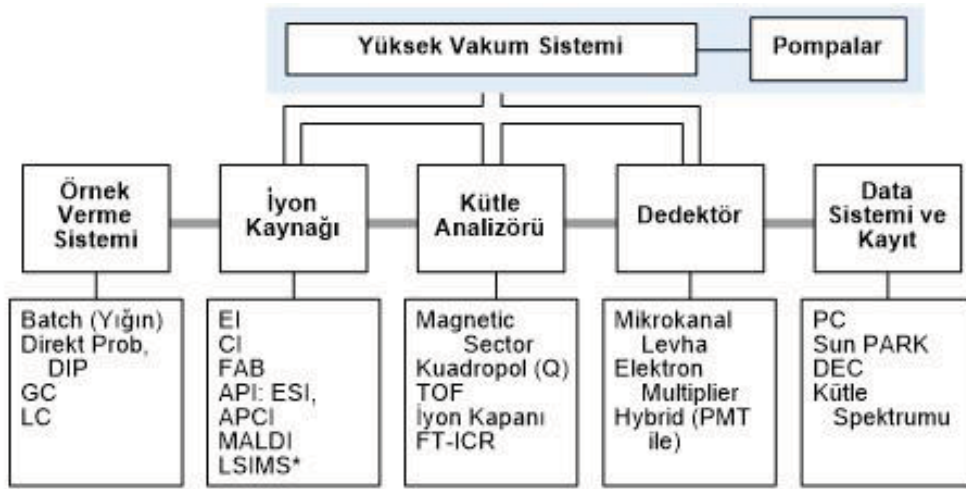
#### **2.4.1.4 Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi**

Hidrofilik Etkileşim Sıvısı Kromatografisi anlamına gelen "HILIC" kısaltması, 1990'da Alpert [75] tarafından yüksek polar bileşiklerin ayrıldığı yeni bir kromatografik tekniği tanımlamak için önerilmiştir. Bu ayırma tekniği, daha sonra şeker ve oligosakkaritlerin analizi için HPLC'de kullanılmıştır [76]. Şimdiye kadar, HILIC, hidroksil katı fazın mevcudiyeti nedeniyle glikoproteomikte en çok kullanılan ayırma araçlarından biri olmuştur. HILIC, hidrofilik ve polar bileşiklerin etkili bir şekilde tutulmasını ve ayrılmasını sağlayan bir sıvı kromatografisi metodudur. Bu yöntem, geleneksel olarak iyon değişim kromatografisi veya iyon eşleştirme ters fazlı kromatografi ile ayrılması gereken iyonik ve iyonlaşabilir bileşiklerin tutulmasını ve ayrılmasını sağlar. HILIC'deki tutma mekanizması, sabit fazın hidrofilik yüzeyi ile ilişkili sulu tabaka ile hareketli fazın organik bileşeni arasındaki, hidrojen bağı, dipol-dipol, elektrostatik hatta hidrofobik etkileşimler gibi diğer tip etkileşimler ile kombinasyonun bir sonucudur. Bir amid veya amino bağılı faz kolonu kullanarak, polar bileşikler normal bir faz veya hidrofilik etkileşim kromatografi tutma mekanizması ile tutulabilir. HILIC'deki tipik mobil fazlar, birincil olarak asetonitril olmak üzere organik değiştiricileri olan sulu tamponlardır. Ters fazdaki tutma davranışının aksine, HILIC'de, sulu fazın yüzdesi artırılarak analitlerin ayrımı sağlanır. Amonyum format ve asetat, HILIC ayırmalarında kullanılmak üzere, organik çözücü sistemlerinde kolayca çözünür oldukları için popüler tamponlardır.

HILIC'in en önemli ve dikkat çekici özelliklerinden birisi kütle spektrometrisi özellikle de elektrosprey iyonlaşma (ESI) ara yüzüyle olan uyumluluğudur. HILIC mobil fazındaki yüksek polar organik çözücü içeriği, ESI arayüzündeki iyonlaşma verimliliğini arttırmakta ve böylece artan kütle hassasiyetine neden olmaktadır. Bu nedenle, HILIC-MS, karmaşık karışımlarda polar bileşiklerin yüksek hassasiyetli, kantitatif analizine uygun bir yaklaşım sunarak daha geniş bir bileşik yelpazesi hakkında bilgi edinmeyi sağlamaktadır.

## 2.4.2 Kütle Spektrometrisi

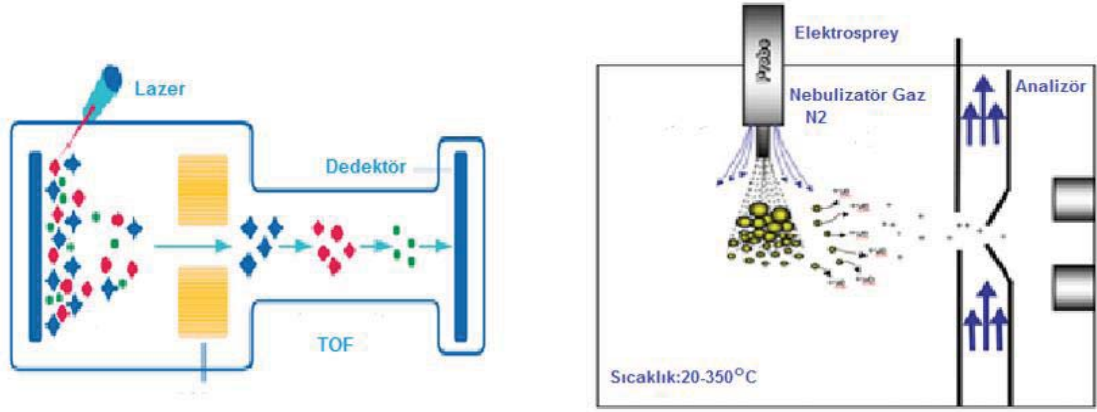
Kütle spektrometresi, atomların veya moleküllerin kütesini belirlemek için kullanılan analitik bir tekniktir. İyonların parçalanması yoluyla, yapısal bilgiler de verir. Tanım olarak, bir kütle spektrometresi bir iyon kaynağından, iyonlaştırılmış analitlerin kütle/yük oranlarını ( $m/z$ ) ölçen bir kütle analizöründen ve her  $m/z$  değerindeki iyon sayısını kaydeden bir dedektörden oluşur. Kütle Spektrometrik sistemler, elektron iyonlaşma, hızlı atom bombardımanı ile iyonlaştırma, elektrosprey iyonlaşma, matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaşmalı gibi iyon kaynaklarından birini ve de kuadropol, uçuş zamanlı, iyon kapanı gibi analizörlerden bir veya birkaçını içerebilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Kütle spektrometrik sistemlerin genel şeması

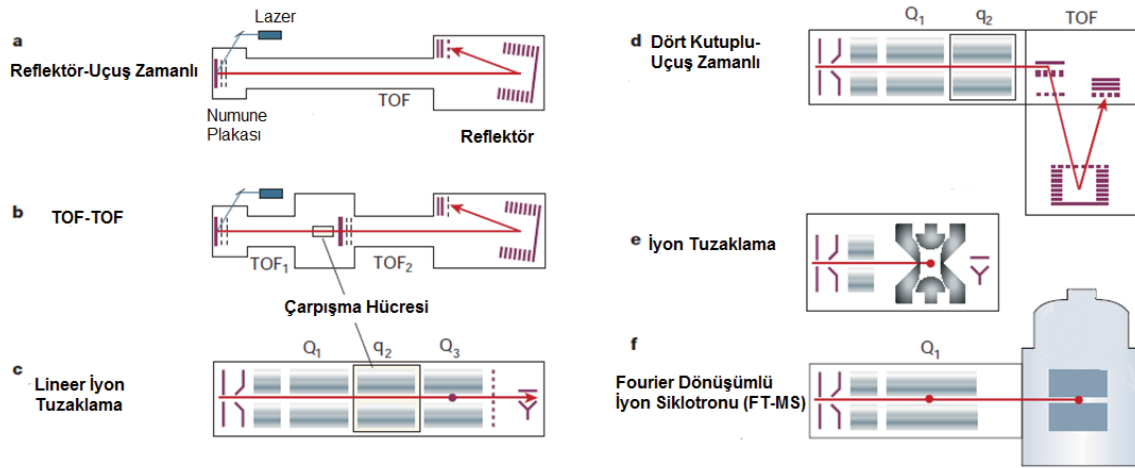
Elektrosprey iyonlaşma (ESI) ve matriks destekli lazer desorpsiyon / iyonlaşma (MALDI), kütle spektrometrik analizleri için proteinleri veya peptitleri uçucu hale getirmek ve iyonlaştırmak için en yaygın kullanılan iki yumuşak iyonlaştırma tekniğidir. ESI, analitleri bir çözeltilerden iyonize eder ve bu nedenle sıvı bazlı (örneğin kromatografik ve elektroforetik) ayırma araçlarına kolayca bağlanır. MALDI ise, numuneleri lazer darbeleriyle kuru, kristalimsi bir matrikste süblime eder ve iyonlaştırır. MALDI-MS normal olarak nispeten basit peptit karışımlarını analiz etmek için kullanılır, ancak karmaşık sıvı numunelerin analizi için entegre sıvı kromatografi ESI-MS sistemleri (LC-MS) tercih edilir.





**Şekil 2.10** MALDI ve ESI yöntemlerinin şematik gösterimi

Bir kütle spektrometre cihazının temel bileşenlerini iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör oluşturmaktadır. Kütle analizörü kelimenin tam anlamıyla ve mecazi olarak da teknolojinin merkezinde yer almaktadır. Proteomik bağlamında baktığımızda, analizörün temel parametreleri hassasiyet, kütle ayırıcılığı, kütle doğruluğu ve peptit fragmentlerinden bilgi bakımından zengin iyon kütle spektrumları üretmesidir. Proteomik çalışmalarında kullanılan dört temel analizör bulunmaktadır. Bunlar, iyon-tuzaklama (ion-trap), uçuş zamanlı (time-of-flight), dört kutuplu (quadropole) ve Fourier dönüşümlü iyon siklotronu (FT-MS) analizörleridir. Her birinin güçlü ve zayıf yönleri bulunmakla birlikte tasarım ve performans açısından birbirlerinden çok farklıdır. Bu analizörler tek başına olabilir veya bazı durumlarda, her birinin güçlü yanlarından yararlanmak için bir araya getirilebilirler.



**Şekil 2.11** Analizörlerin şematik gösterimi

### 2.4.2.1 N-glikan Analizlerinde Kütle Spektrometrik Yaklaşımlar

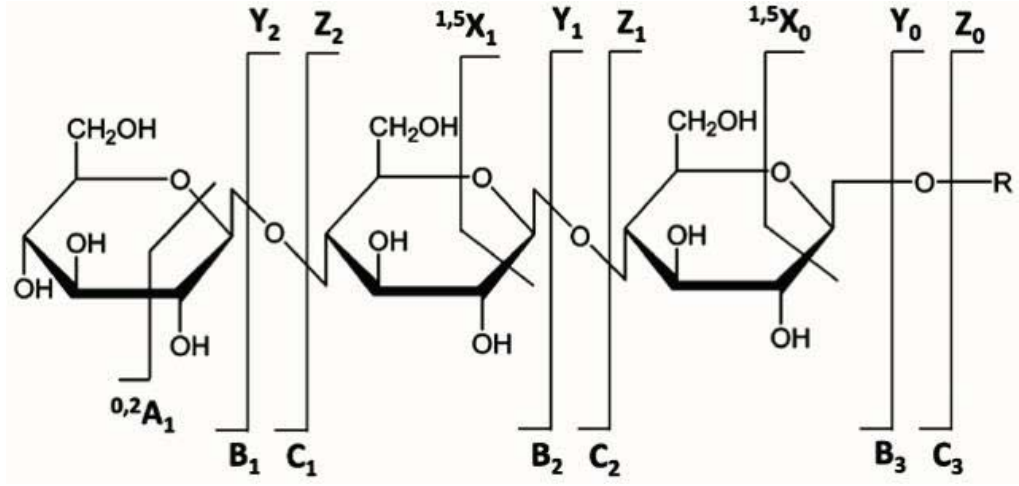
Oligosakkaritler, glikozidik bağlarla bağlı birkaç monosakkaritin birleşmesiyle oluşan moleküllerdir. Oligosakkaritlerin tüm yapısının belirlenmesi, proteinlerden veya oligonükleotidlerden daha karmaşıktır. Monosakkaritlerin izomerik doğası ve lineer veya dallı oligosakkaritler oluşturma kapasitelerinin bir sonucu olarak ek bileşenlerin belirlenmesini içerir. Bir oligosakkaritin yapısını bilmek, sadece monosakkarit dizisinin ve dallanma düzeninin belirlenmesini değil, aynı zamanda izomer pozisyonunu ve glikozidik bağlarının her birinin anomerik konfigürasyonunu gerektirir. Glikobiyolojideki gelişmeler, yapıların, biyosentezlerin ve şeker ve sakkaritlerin biyolojisinin kapsamlı bir çalışmasını içerir. Kütle spektrometresi, glikomik ve glikobiyoloji alanında olanak sağlayan bir teknoloji olarak ortaya çıkmaktadır.

ESI ve MALDI-MS'deki son gelişmeler ve küçük ölçekli numune hazırlama prosedürlerinin geliştirilmesi nedeniyle, glikozilasyonları hızlı bir şekilde karakterize etmek için gerekli olan numune miktarı pikomol seviyesine inmiştir. Glikomikte MS tek başına kesinlikle gerekli tüm cevapları verememektedir. Her glikozilasyonun detaylarını tamamen belirlemek için, MS farklı tekniklerle birleştirildiğinde güçlü bir araç haline gelir. Bunlar, örneğin, serbest glikanların veya glikopeptitlerin spesifik ekzo veya endoglikozidazlarla parçalanmasını ve ardından MS ile reaksiyon ürünlerinin tespitini ve tek tek glikanların kompozisyon analizi için küçük ölçekli

monosakkarit analizini içerir. Glikan sekanslaması ayrıca MS / MS fragmentasyon verileri kullanılarak serbest ve türetilmiş glikanların analizi ile elde edilebilir.

Süt numuneleri analizinde kütle spektrometresi incelemeleri genellikle bir ön-fraksiyonlama basamağı ile birleştirilir. Bununla birlikte, günümüzde çoğunlukla, parçalanmış proteinlerin proteolitik fragment analizi için bir kütle spektrometresi ile birleştirilmiş LC veya iki boyutlu nanoLC uygulanmaktadır. Kütle spektrometresi ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisinin kullanımı, glikan analizi için tercih edilen araç haline gelmektedir. LC-MS, glikanların ayrılmasını sağlar, böylece iyonlaşma sırasında baskılama etkilerini en aza indirir. Ayrıca, uygun kompozisyonlar kullanıldığında, aynı bileşimleri (izomerleri) paylaşan glikanların ayrılması, LC-MS analizi sırasında mümkündür. Süt proteinlerinin N-glikanlarının kapsamlı karakterizasyonunda ek bir komplikasyon, sığırlarda genellikle insanlarda bulunmayan, sığır sütünde N-glikolilnöraminik asidin (NeuGc) bulunmasıdır. NeuGc kesinlikle kesin kütleyle dayalı bileşimin belirlenmesini önler, çünkü fukoz (Fuc) ve NeuGc kombinasyonları, N-asetilnöraminik asit (NeuAc) ve heksoz (Hex) içeren oligosakkaritlere eşdeğer kütleler verebilir. Örneğin, 1931.69 Da nötr kütle (GlcNAc4: Hex5: NeuAc1) 'e karşılık gelebilir, ancak NeuGc mevcutsa (GlcNAc4: Hex4: Fuc1: NeuGc1) de karşılık gelebilir. Bu nedenle, bu tür bir analiz için tandem MS gereklidir. Nano-LC – MS analizi süt glikan profillerini verirken, tandem MS analizi, monosakkarit bileşimlerini ve bazı durumlarda monosakkarit bağlantılarını ortaya çıkarır. Glikan MS / MS verileri, tandem MS analizleri sırasında monosakkarit ve disakkarit fragmanlarından kaynaklanan belirli okzonyum iyonlarının varlığı ile tanımlanır. Kütle spektrometresi, glikomik araştırmalarında üstün tanımlama yeteneği ve ayrıntılı yapısal bilgi sağlayan en güçlü analitik tekniklerden biridir. MS ile birleştirilmiş sıvı kromatografisi, süt oligosakkaritlerinin en kapsamlı kalitatif ve kantitatif analizlerini sağlayacaktır.

Kütle spektrumunda N-glikan sinyallerinin belirlenebilmesi için bu glikanlara ait yapılarında bulunan bazı şekerlerin kütleleri takip edilir. Genelde N-glikanlar, N-asetil heksoz [HexNAc+H]<sup>+</sup> (204.1 Da), heksoz ve N-asetil heksoz [Hex+HexNAc+H]<sup>+</sup> (366.1 Da) ve N-asetil nöraminik asit (NeuAc) [Hex+HexNAc+NeuAc+H]<sup>+</sup> (657.1 Da) kütleleri takip edilerek belirlenir.



**Şekil 2.12** Glikanların parçalanma bölgelerinin şematik gösterimi

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1 Kullanılan Kimyasallar

Keçi ve İnek (Isparta/Eğirdir), Eşek (Isparta), Manda (Karabük) sütleri çeşitli illerdeki mandıralardan toplanmıştır.

Prokainamid hidroklorür ajanı Abcam (Cambridge, United Kingdom); Super-DHB matriksi Fluka; sodyum fosfat Merck; Etanol, asetik asit, dimetil sülfoksit, sodyum siyanoborohidrür, Sigma Aldrich (St. Louis, MO USA); PNGase F enzimi, Nonidet P-40 çözültisi Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) firmasından satın alınmıştır. Çalışmada, tüm deneyler de-iyonize su sistemi (Mirae St Co. Ltd, Güney Kore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2 Whey Proteinlerinin Ekstraksiyonu ve Deglikozilasyon

Süt whey proteinlerinin ekstraksiyonu, Y. Mechref ve ark. [77] tarafından açıklanan yöntemle göre yapılmıştır. Süt kaynağından üç farklı mikro-tüpe süt örnekleri alınmış ve aynı protokole tabi tutulmuştur. 500 µL'lik bir süt numunesi, 500 µL deiyonize su ile karıştırıldı ve 60 dakika boyunca 4 ° C'ta ve 1.5 krpm'de santrifüjlendi. Karışım üç katmana ayrıldı. Whey proteini ve serbest oligosakkaritlerden oluşan ortadaki sulu katman dikkatlice toplandı. Daha sonra, ekstrakte edilen orta tabakaların her birine 500 µL'lik bir kısım %90 etanol soğuk sulu çözültisi ilave edildi. Karışım daha sonra 20 dakika boyunca -20 °C'ta inkübe edildi ve ardından 10 dakika boyunca 14.8 krpm'de santrifüjlendi. Süpernatantlar ayrıldı ve çökeltilmiş proteinlerden oluşan kısım vakum altında kurutuldu. Kurutulan whey proteinleri 100 µL G7 tamponu (50 mM Sodyum Fosfat pH:7.5) ile çözüldü. 90 °C'ta 20 dk denatüre edilen örnekler, oda sıcaklığına geldikten sonra 1,2 µL PNGase F enzimi eklenerek 37 °C'ta 18 saat inkübe edildi. Glikan salınımı sonrası örnekler 500 µL %90 etanol soğuk sulu çözültisi ilave edildi. Karışım daha sonra 20 dakika boyunca -20 °C'de inkübe edildi ve ardından 10 dakika boyunca 14.8 krpm'de santrifüjlendi. Bu aşamadan sonra süpernatant kısmında elde edilen N-glikanlar alınarak vakum altında kurutuldular.

### 3.3 N-glikanların Prokainamid ile Etiketlenmesi

N-glikanların hem yapılarını kararlı hale getirmek hem de kütle spektrometrik analizler için yüksek iyonlaşma verimi ve floresans özellik kazandıran prokainamid reaktifi ile etiketlenmiştir. Etiketleme çözeltisi, prokainamid (11 mg) ve sodyumsiyano-borohidrürün (6 mg) 100 µL DMSO:CH<sub>3</sub>COOH (70:30 v/v) içerisinde çözülerek taze hazırlanmıştır. Whey proteinlerinden glikan salınımı sonrası kurutularak elde edilen N-glikan örneği üzerine 25 µL proc etiketleme çözeltisi eklenerek thermomixer de 400 rpm 65 °C'ta 2 saat inkübe edilmiştir.

### 3.4 N-glikanların HILIC-SPE Yöntemi ile Zenginleştirilmeleri

Proc ile etiketlenen N-glikan örneklerini saflaştırmak için pipet ucuna yerleştirilen pamuk ile hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi (HILIC) tekniği uygulanmıştır. 100 µL'lik pipet ucuna 0,2 mg pamuk bir kapiler yardımıyla sıkıştırıldı. Kolon şartlama için 5 kez deiyonize su ve 5 kez %85 asetonitril çözeltisinden 100 µL çekilip bırakıldı. 15 µL proc etiketli N-glikan karışımı 85 µL asetonitril ile karıştırıldı. Hazırlanan kolon bu çözeltiden 20 kez çekilip bırakılarak yükleme yapıldı. Kolon 5'er kez %0,1 TFA içeren %85 ACN çözeltisi ve %85 ACN çözeltisi ile yıkandı. Elüsyon işlemi 25 µL deiyonize su ile 20 kez çekilip bırakılarak gerçekleştirildi.

### 3.5 HPLC-FLD-QTOF-MS/MS Analizleri

HPLC-HILIC-FLD analizleri Agilent 1260 serisi FLD detektör içeren bir Agilent 1200 serisi HPLC ile gerçekleştirilmiştir. N-glikanların analitik olarak ayrılmasında Waters Glycan BEH Amide 1,7 µm (2.1 mm ID x 15 cm L) HILIC kolonu kullanılmıştır. Floresans detektörünün uyarma ve emisyon dalga boyu sırasıyla 310 nm ve 370 nm olarak ayarlanmıştır. Saflaştırılmış prokainamid etiketli N-glikanlara (25 µL) uygun yükleme koşulu elde edebilmek amacıyla 75 µL asetonitril ilave edildikten sonra bu çözeltinin 30 µL'si analiz için enjekte edilmiştir. Akış hızı 0.2 mL/dk olarak ayarlandı. Kolon sıcaklığı 60 ° C'a ayarlandı. Hareketli faz A ve B olarak sırasıyla 50 mmol/L amonyum format (pH 4.3) ve asetonitril kullanılmıştır. Ayrılma, 120 dakikalık bir çalışmada %75-52 asetonitril (h / h) doğrusal gradyan kullanılarak gerçekleştirildi. MS koşulları; kapiler gerilimi 4.5 kV, kaynak sıcaklığı 180 °C, nebulizatör gazı 1.2 bar, kurutma gazı 7 L/dk ve MS edinimi, 1 Hz frekansında 50 ila 2800 m/z arasında gerçekleştirilecek şekilde ayarlanmıştır.

MS/MS deneyleri, 0.5 Hz ila 2 Hz spektrum hızında en bol bulunan üç öncü iyonun seçilmesiyle gerçekleştirildi. Bu analizlerde her bir N-glikanın kromatogramda gözlemlendiği zamanın kesin olarak belirlenmesi için sıvı kromatografisi aynı şartlarda ESI-QTOF-MS/MS'e bağlanmıştır. Bu sayede N-glikan yapılarının doğruluğu sağlanmıştır. Şekil 4.1'de çalışmalarda izlenecek yolun basit bir şeması görülmektedir.

### 3.6 Veri Analizleri

Kütle spektrometrik analizlerden elde edilen MS/MS verileri xml. dosya tipine Bruker Data Analysis yazılımı kullanılarak dönüştürüldükten sonra Protein Scape yazılımına veriler gönderildi. Protein Scape yazılımında prokainamid etiketli glikanlar için yapılan arama parametreleri şekil 3.1'de verilmiştir.

The screenshot shows the Protein Scape software interface with the following settings:

- General Settings:**
  - Select search method: Ludger Procainamide
  - Method name: Ludger Procainamide
  - Version: 1.13
  - Submit: CID/LID (all)
  - Classified as: glycopeptide, glycan, OXONIUM IONS, N-glycopeptide
  - Include not successfully classified spectra:
  - Assessment:
  - Configure Rights...
- GlycoQuest:**
  - Glycan type: N-Glycan core basic
  - Database: CarbBank
  - Modifications: Sulfate, N-Sulfate, O-methyl, Phosphate
  - Derivatization: UND
  - Use reducing end as defined below:
  - Reducing end mass: 219.173548
  - Ions: H+, Na+, K+, Li+
  - Neutrals: Water, Ammonia, Sodium, Potassium
  - Charge +: 1 to 4
  - Charge -: 1 to 4
  - # <sup>13</sup>C: 1
  - Fragmentation type CID: CID b c y z i 3CL
  - Threshold for glycan list compilation:
    - Score >: 20.0
    - Fragmentation coverage [%] >: 20.0
    - Intensity coverage [%] >: 10.0
  - Taxonomy: All taxonomies
  - Composition: ---
  - Reducing end: Free end
  - Use available reducing end from list:
  - Reducing end name: proc
  - H+ up to: 4
  - MS tolerance (m/z): 0.05 Da
  - MS/MS tolerance (m/z): 0.01 Da
  - Monoisotopic:  Average:
  - ETD: ETD

**Şekil 3.1** Protein Scape parametreleri

N-glikan pikinin altında kalan alan belirlenerek her bir glikana ait göreceli bolluk belirlenmiştir. Burada aşağıdaki formül kullanılarak her bir tespit edilen N-glikanın göreceli bolluğu hesaplanmıştır.

$$\% \text{ N-glikan Göreceli Bolluğu} = (\text{N-glikan alanı} / \text{Toplam N-glikan alanı}) * 100$$

## 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

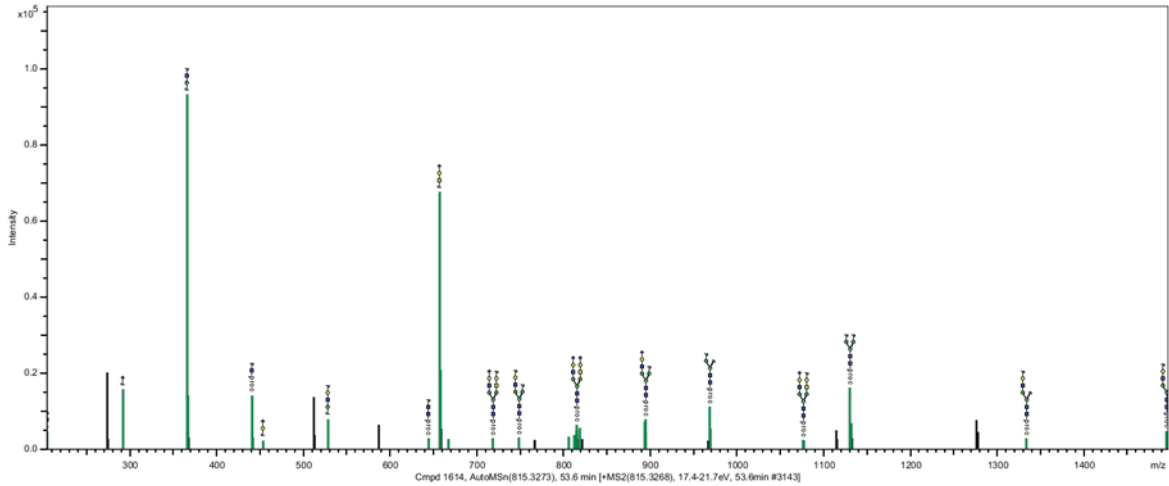
Süt örneklerinin analizleri öncesi ilk olarak whey proteinlerinin ekstraksiyonu yöntemde anlatıldığı gibi her bir süt türü için gerçekleştirildi. Sonrasında whey glikoproteinlerinden glikan birimlerinin elde edilmesi amacıyla deglikozilasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra proc etiketi ile whey glikoproteinlerinden salınan glikanlar indirgeyici uçlarından etikenlendi. Proc etiketli glikanların saflaştırılmaları sonrasında HPLC-HILIC-FLD-QTOF-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. Bu aşamalar şekil 4.1’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.1** Yöntem akış şeması



Analizler sonrasında elde edilen tüm MS/MS verileri, Bruker firmasına ait Protein Scape yazılımına yüklendikten sonra GlycoQuest uygulaması ile Proc etiketli glikanlar tespit edilmesine yönelik taramalar gerçekleştirildi. Burada MS/MS verilerine odaklanılarak her bir N-glikana ait bir skor elde edildi. Bu sayede MS/MS düzeyinde glikan yapıları doğrulanmıştır. Şekil 4.2’de Protein Scape yazılımında tespit edilen bir N-glikan yapısının (H5N4S2) MS/MS spektrumu görülmektedir.



**Şekil 4.2** Protein Scape yazılımının tespit ettiği bir N-glikan yapısına ait otomatik sekanslanmış bir MS/MS spektrumu

Tablo 4.1’de ise bu spektruma ait parçalanma ürünlerinin yazılım tarafından listelenmiş hali görülmektedir. Yazılım, tespit edilen parçalanma ürünlerine odaklanarak glikan yapısının sekanslanma yüzdesini vermektedir. Ayrıca her tespit edilen glikan için bir skor belirlemektedir. Çalışmada tespit edilen tüm N-glikan türlerinin yapılarının doğrulanması burada bahsedilen işlemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir tespit edilen N-glikan türü için FLD kromatogramlarındaki konumları, glikanların yapıları doğrulandıktan sonra kolonda alıkonma zamanları dikkate alınarak belirlenmiştir. Ayrıca manuel olarak MS1 spektrumları tespit edilen N-glikanların ekstrakte iyon kromatogramları ile FLD kromatogramı kıyaslanarak konumlar doğrulanmıştır.

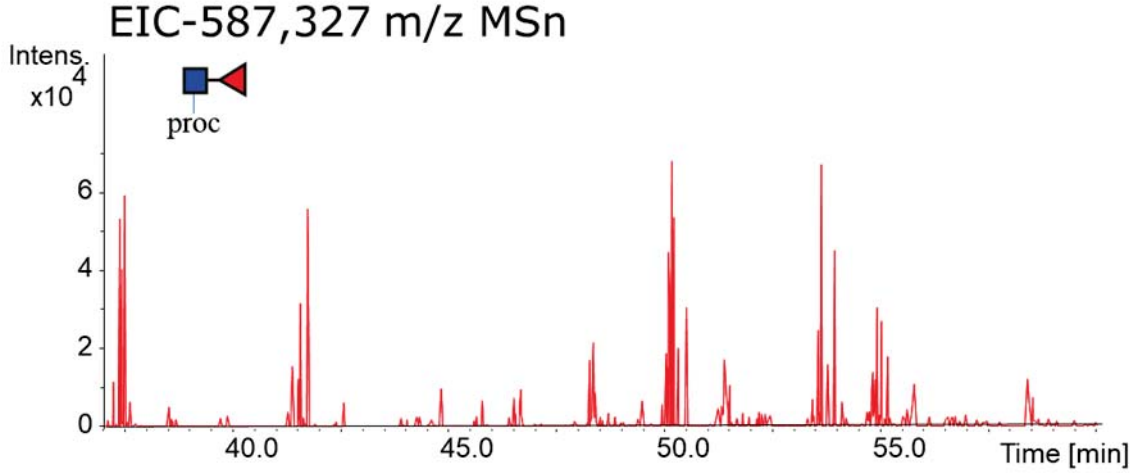
**Tablo 4.1** Spektruma ait parçalanma ürünleri

Sıra	Parçalanma Ürünü	m/z ölçülen	z	Mr hesaplanan	$\Delta$ MH+ [Da]
1	BY	204,0799	1	203,0794	-0,0067

2	B	292,0977	1	291,0954	-0,0050
3	BY	366,1358	1	365,1322	-0,0037
4	BY	367,1394	1	366,1409	-0,0087
5	Y	441,2669	1	440,2635	-0,0038
6	Y	442,2702	1	441,2722	-0,0092
7	B	454,1517	1	453,1482	-0,0038
8	BY	528,1896	1	527,1850	-0,0027
9	Y	644,3487	1	643,3429	-0,0014
10	B	657,2322	1	656,2276	-0,0027
11	B	658,2356	1	657,2363	-0,0079
12	YY	806,3992	1	805,3957	-0,0038
13	B	819,2851	1	818,2804	-0,0026
14	YY	968,4519	1	967,4485	-0,0039
15	YY	969,4557	1	968,4572	-0,0087
16	YY	1130,5041	1	1129,5013	-0,0045
17	YY	1131,5080	1	1130,5100	-0,0092
18	YY	1333,5835	1	1332,5807	-0,0045
19	YY	667,2955	2	1332,5807	-0,0044
20	YY	1495,6341	1	1494,6335	-0,0067
21	YY	748,3214	2	1494,6335	-0,0054
22	Y	812,8426	2	1623,6761	-0,0054
23	Y	813,3450	2	1624,6848	-0,0093
24	Y	893,8692	2	1785,7289	-0,0050
25	Y	894,3712	2	1786,7376	-0,0098
26	Y	1076,4320	2	2150,8611	-0,0116
27	Y	1076,9380	2	2151,8698	-0,0083
28	Y	718,2934	3	2151,8698	-0,0116
29		814,9903	3	2441,9566	-0,0075
30		815,3256	3	2442,9652	-0,0104

Prokainamid ile etiketlemede N-glikan yapılarının doğrulanmasında çeşitli MS/MS iyonları takip edilmektedir. Bunlardan bir tanesi çekirdek tipli N-glikanların belirlenmesinde kullanılan 587,327 m/z parçalanma ürünüdür. Bu parçalanma ürünü prokainamid etiketli HexNAc+Fukoz [prokainamid +HexNAc+Fukoz+H]<sup>+</sup> bağlantısını göstermektedir. Bu sayede tespit edilen glikan yapılarının glikan çekirdeğinde bulunan HexNAc'tan mı yoksa antende bulunan HexNAc

monosakkaritine mi bağılı fukoz yapısı içerdiği doğrulanmaktadır [78]. Örneğin insan whey proteinine ait N-glikanların 587,327 m/z parçalanma ürünü içeren MS/MS spektrumlarına ait ekstrakte iyon kromatogramları Şekil 4.3'te görülmektedir.

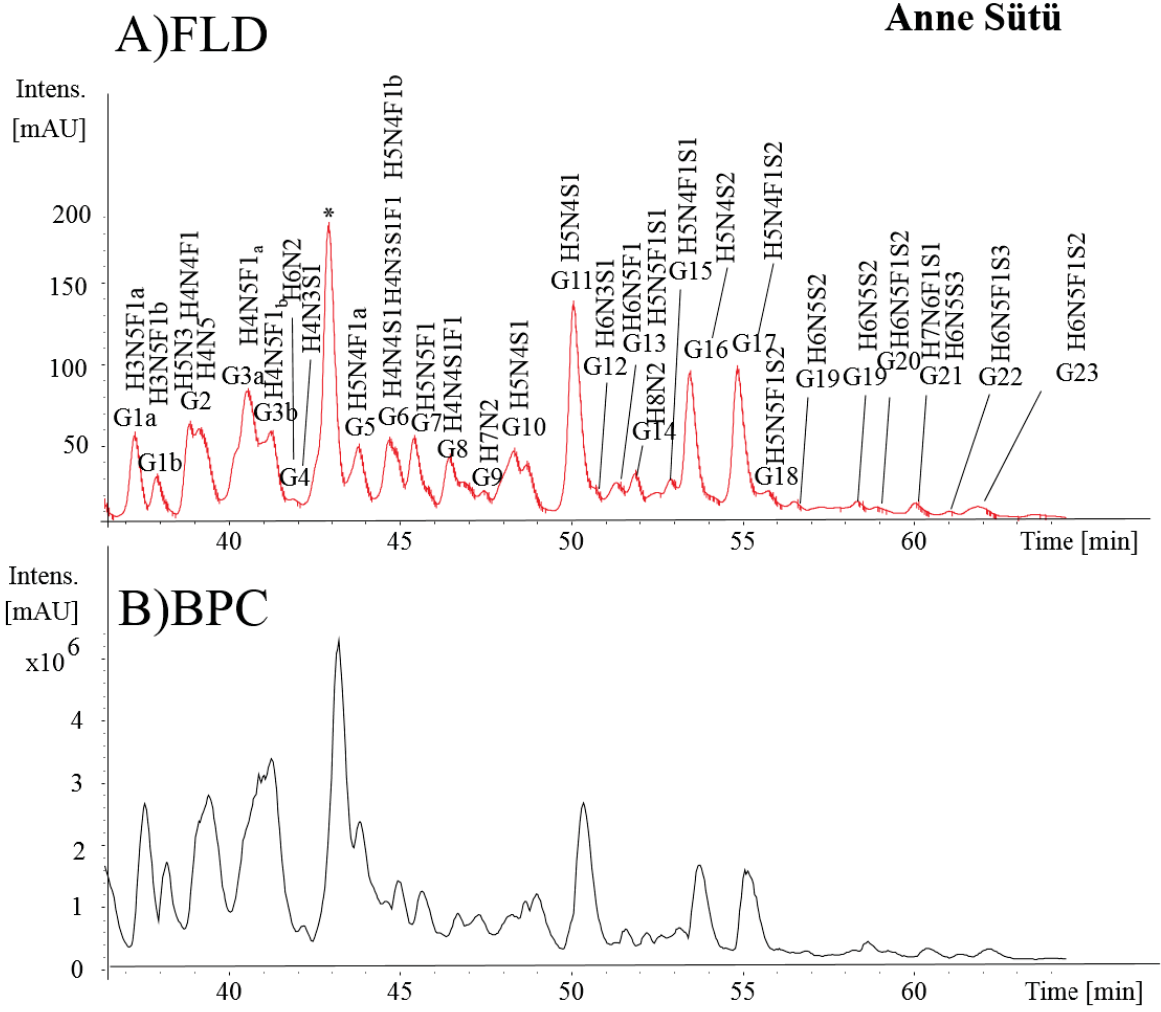


**Şekil 4.3** 587,327 m/z parçalanma ürünü içeren N-glikan MS/MS spektrumlarının ekstraksiyonu sonucu elde edilmiş kromatogram

Burada bahsedilen iyonu içeren öncül iyon veya N-glikan yapısı için çekirdekten fukozlanmış doğrulaması MS/MS spektrumları incelenerek yapılabilmektedir.

#### 4.1 Anne Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları

Çalışmada 20 anne sütü örneği eşit hacimlerde karıştırıldıktan sonra whey (gliko)proteinlerinin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalar 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Whey (gliko)proteinlerinin deglikozilasyonu sonucu elde edilen glikan yapıları prokainamid ile etiketlendikten sonra analizleri öncesi pamuk içeren pipet ucu ile saflaştırıldı. Sonrasında etiketlenmiş glikanlar, HPLC-HILIC-FLD-QTOF-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Elde edilen MS/MS spektrumları protein scape yazılımına gönderildikten sonra glikan yapıları belirlendi. Şekil 16'da analizler sonucu elde edilen floresans (FLD) ve temel pik kromatogramı (BPC) görülmektedir.



**Şekil 4.4** Anne sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları. \*: serbest süt oligosakkaritine ait pik

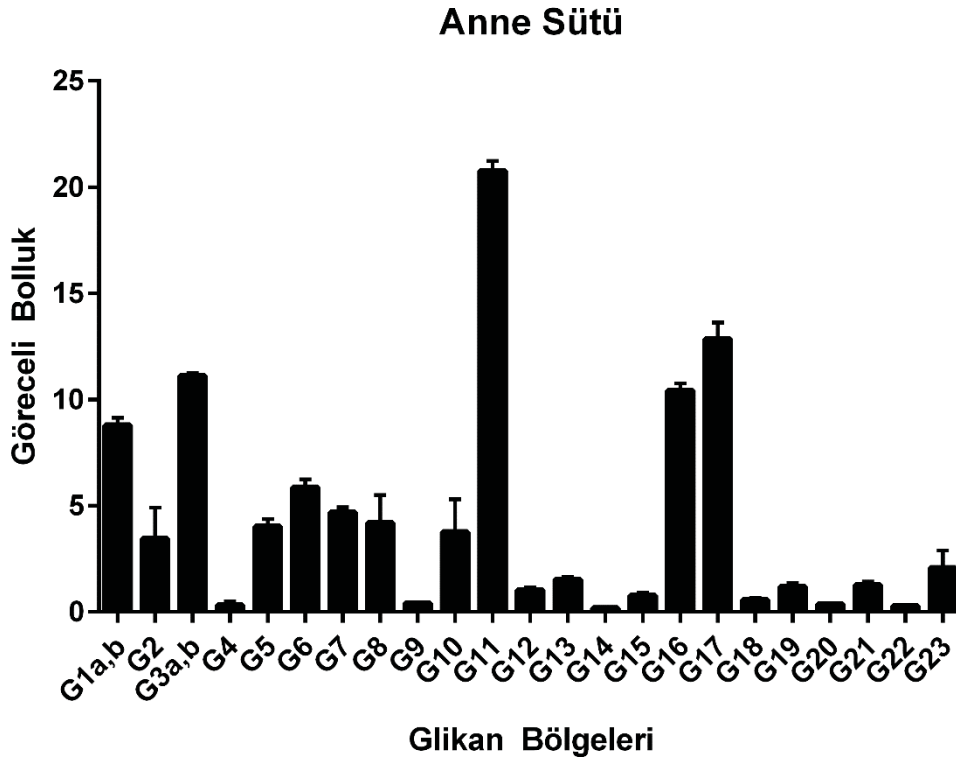
Yapılan analizler sonucunda anne sütüne ait 27 N-glikan yapısı MS/MS düzeyinde doğrulanmıştır. MS1 spektrumları dikkate alınarak floresans kromatogramlarındaki alıkonma zamanları tespit edilmiştir. Anne sütü içeriğinde yüksek oranda serbest oligosakkarit bulunmaktadır. Bu serbest oligosakkarit yapıları proteinlere bağlı olmayan kompleks şekerlerdir ve miktarları diğer süt türleri ile kıyaslandığında oldukça yüksektir. Anne sütünde 5-15 g/L konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. Bu rakam inek sütü için 0.05 g/L'dir [79]. Bu nedenle analizlerde serbest süt oligosakkarit yapılarının girişim yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.4). Her ne kadar örnek hazırlama metodu süt whey (gliko)proteinlerinin analizlerine yönelik olsa da anne sütünde yüksek oranda bulunan serbest süt oligosakkaritlerin whey proteinleri ile etkileşime girerek örnek içerisinde kaldığı yapılan analizlerden

gözlemlenmiştir. Bunu engellemek için ekstrakte ve liyofilize edilen whey proteinleri belirli çözücülerle yıkansa da burada bir başarı sağlanamamıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda aynı ekstraksiyon yöntemi kullanılmasına rağmen bu soruna değinilmemiş olması muhtemelen sadece kütle spektrometrik tanımlamaya bağlı yapılan ölçümlerden kaynaklanmaktadır [80]. Literatür incelendiğinde tespit edilen whey N-glikanlarının ekstrakte edilmiş kütle spektrumları göz önünde bulunarak analizler başarılmıştır. Burada kullanılan yöntem floresans ölçümüne dayalı olduğundan serbest süt oligosakkaritlerin girişimi net olarak çalışmada gözlemlenmiştir. Şekil 4.4'te "\*" olarak gösterilen pik anne sütü serbest süt oligosakkaritlerinden kaynaklanmaktadır.

**Tablo 4.2** Anne sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları

Bölge	N-glikan Bileşimi	Kütle Bilgisi	m/z ölçülen	m/z hesaplanan	$\Delta$ MH+ [Da]	Rt [dk]	Skor	Sekanslama Yüzdesi [%]	Ortalama Göreceli Bol.	Standart Sapma
G1a,b	Hex3HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	943.4083	943.4060	0.0047	38.69	84.0	98	8.80	0.34
		[2H+](2)-proc=219u	829.3496	829.3505	-0.0018	39.41	55.6	58	3.45	1.47
G2	Hex4HexNAc5-ProA	[2H+](2)-ProA=219u	951.4002	951.4034	-0.0065	39.46	95.9	105		
		[2H+](2)-proc=219u	922.8854	922.8927	-0.0145	39.90	64.5	52		
G3a,b	Hex4HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1024.4290	1024.4324	-0.0068	41.59	67.8	55	11.12	0.13
		[2H+](2)-proc=219u	893.8674	893.8717	-0.0086	42.23	63.7	55	0.33	0.16
G4	Hex6HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	808.8330	808.8372	-0.0084	42.49	92.5	107		
		[2H+](2)-proc=219u	1003.9147	1003.9191	-0.0088	44.86	70.7	60	4.03	0.34
G5	Hex5HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	995.4059	995.4114	-0.0112	44.70	63.4	61		
		[2H+](2)-proc=219u	966.8948	966.9007	-0.0117	44.28	57.2	43	5.86	0.38
G6	Hex4HexNAc3NeuAc1dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	669.6117	669.6152	-0.0103	44.85	87.1	87		
		[3H+](3)-proc=219u	1105.4516	1105.4588	-0.0143	45.81	51.6	43	4.69	0.24
G7	Hex5HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1068.4334	1068.4404	-0.0139	46.51	51.8	35	4.19	1.32
		[2H+](2)-proc=219u	889.8614	889.8636	-0.0044	47.55	106.0	125	0.42	0.04
G8	Hex7HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	717.9606	717.9610	-0.0013	48.57	83.2	80	3.76	1.54
		[3H+](3)-proc=219u	717.9593	717.9610	-0.0050	50.58	44.4	63	20.76	0.48
G9	Hex6HexNAc3NeuAc1-ProA	[2H+](2)-proc=219u	1055.9224	1055.9246	-0.0044	50.70	44.6	33	1.03	0.12
		[2H+](2)-proc=219u	1186.4799	1186.4852	-0.0105	51.06	51.6	48	1.53	0.13
G10	Hex5HexNAc5NeuAc1dHex1-ProA	[2H+](2)-proc=219u	1250.9992	1251.0065	-0.0145	51.27	60.0	44		
		[2H+](2)-proc=219u	970.8865	970.8900	-0.0070	51.98	112.2	139	0.19	0.03
G11	Hex8HexNAc2-proc	[3H+](3)-ProA=219u	766.6461	766.6470	-0.0026	52.19	69.6	52	0.78	0.12
		[3H+](3)-[1]-proc=219u	815.3273	815.3290	-0.0052	53.56	70.8	64	10.43	0.33
G12	Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219u	863.6741	863.6788	-0.0140	54.83	52.0	35	12.85	0.78
		[3H+](3)-proc=219u	931.3700	931.3719	-0.0058	55.62	50.7	32	0.57	0.08
G13	Hex6HexNAc5NeuAc2-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219u	937.0384	937.0397	-0.0042	56.53	53.2	48	1.20	0.16
		[3H+](3)-[1]-ProA=219u	985.7201	985.7257	-0.0170	58.88	46.5	40	0.37	0.04
G14	Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	1010.0711	1010.0684	0.0081	59.96	44.7	34	1.27	0.16
		[3H+](3)-ProA=219u	1033.7380	1033.7353	0.0079	60.00	57.4	50		
G15	Hex6HexNAc5NeuAc3-ProA	[3H+](3)-[1]-ProA=219u	1082.7500	1082.7575	-0.0225	61.39	58.2	49	0.28	0.05
		[3H+](3)-[1]-proc=219u	985.7293	985.7257	0.0106	62.18	47.80	30.67	2.08	0.81

Tablo 4.2’de anne sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları görülmektedir. Çalışmalar neticesinde anne sütü N-glikanları arasında en bol olarak bulunanı H5N4S1 glikan tipidir. Bu glikan toplam glikan havuzu içerisinde %20,76’yı kapsamaktadır. Bu N-glikan tipini sırasıyla %12,85, %11,12 oranlarıyla H5N4F1S2, H4N5F1 glikanları takip etmektedir. Veriler incelendiğinde en düşük miktarda bulunan N-glikan yapısı %0,19 oranla H8N2 glikanı olarak bulunmuştur. Şekil 4.5’te tespit edilen glikan bölgelerinin göreceli bolluklarını içeren bir grafik görülmektedir.



**Şekil 4.5** Anne sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları

Temel N-glikan grupları incelendiğinde toplam fukozlanma %61,87 ve toplam siyalik asit içerme oranı ise %61,11 bulunmuştur. Bu değişimler tablo 4.3’te görülmektedir.

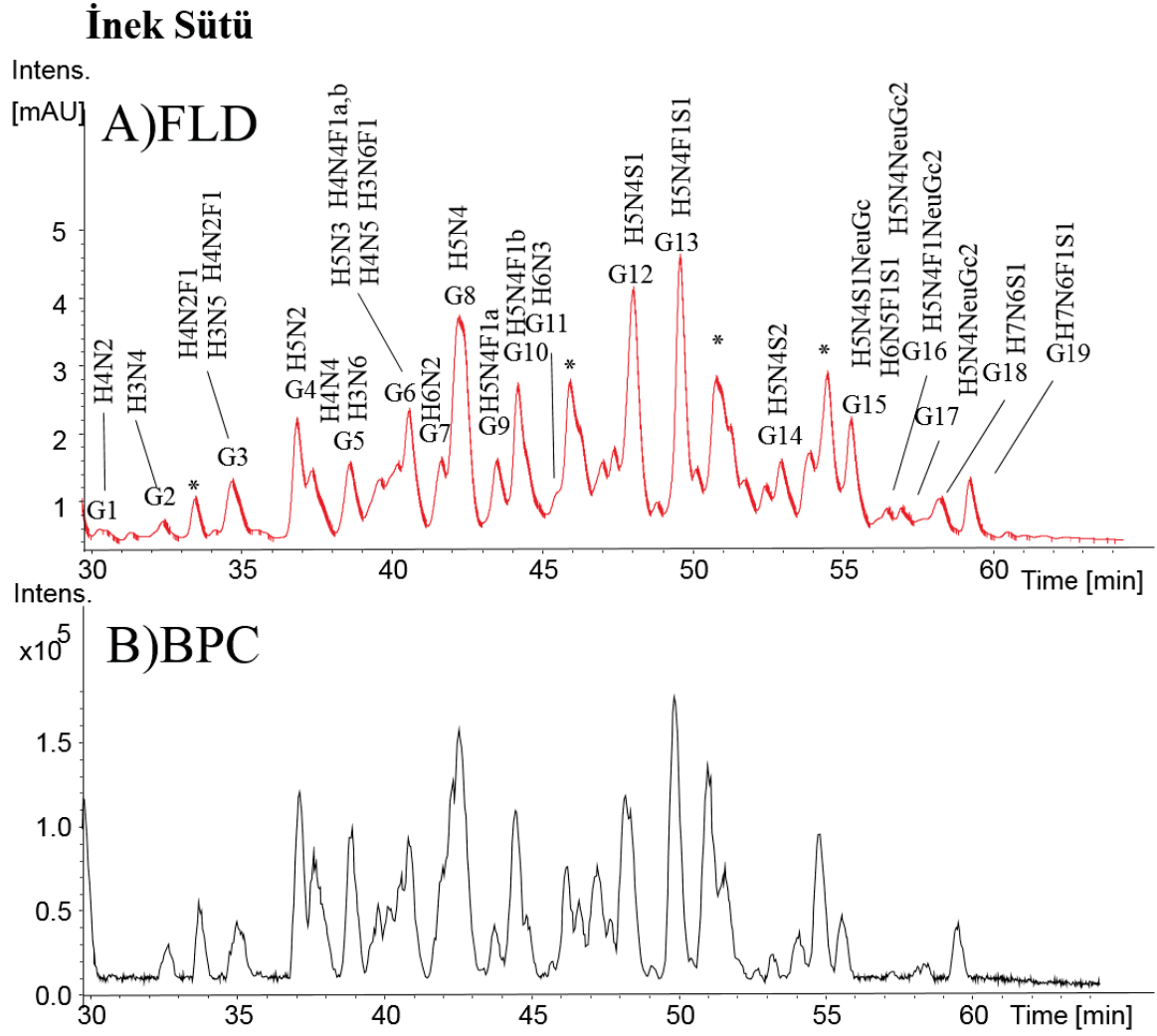
**Tablo 4.3** Anne sütüne ait toplam fukozlanma ve siyalillenme oranları

Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk	Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk
Fukozlanmış		Siyalillenmiş	
Hex3HexNAc5dHex1-proc	8.80	Hex4HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	4.19
Hex4HexNAc4dHex1-proc	3.45	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	3.76
Hex4HexNAc5dHex1-proc	11.12	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	20.76
Hex5HexNAc4dHex1-proc	4.03	Hex6HexNAc3NeuAc1-proc	1.03
Hex4HexNAc3NeuAc1dHex1-proc	5.86	Hex5HexNAc5NeuAc1dHex1-proc	1.53
Hex5HexNAc4dHex1-proc		Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	0.78
Hex5HexNAc5dHex1-proc	4.69	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	10.43
Hex4HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	4.19	Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	12.85
Hex6HexNAc5dHex1-proc	1.53	Hex5HexNAc5NeuAc2dHex1-proc	0.57
Hex5HexNAc5NeuAc1dHex1-proc		Hex6HexNAc5NeuAc2-proc	1.20
Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	0.78	Hex6HexNAc5NeuAc2dHex1-proc	0.37
Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	12.85	Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	1.27
Hex5HexNAc5NeuAc2dHex1-proc	0.57	Hex6HexNAc5NeuAc3-proc	
Hex6HexNAc5NeuAc2dHex1-proc	0.37	Hex6HexNAc5NeuAc3dHex1-proc	0.28
Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	1.27	Hex6HexNAc5NeuAc2dHex1-proc	2.08
Hex6HexNAc5NeuAc3dHex1-proc	0.28		
Hex6HexNAc5NeuAc2dHex1-proc	2.08		
	<b>61.87</b>		<b>61.11</b>

#### 4.2 İnek Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları

Çalışmada 13 adet inek sütü eşit hacimlerde karıştırıldıktan sonra whey (gliko)proteinlerinin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalar 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Whey (gliko)proteinlerinin deglikozilasyonu sonucu elde edilen glikan yapıları prokainamid ile etiketlendikten sonra analizleri öncesi pamuk içeren pipet ucu ile saflaştırıldı. Sonrasında etiketlenmiş glikanlar, HPLC-HILIC-FLD-QTOF-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Elde edilen MS/MS spektrumları protein scape yazılımına gönderildikten sonra glikan yapıları belirlendi. Şekil 4.6'da analizler sonucu elde edilen floresans (FLD) ve temel pik kromatogramı (BPC) görülmektedir.





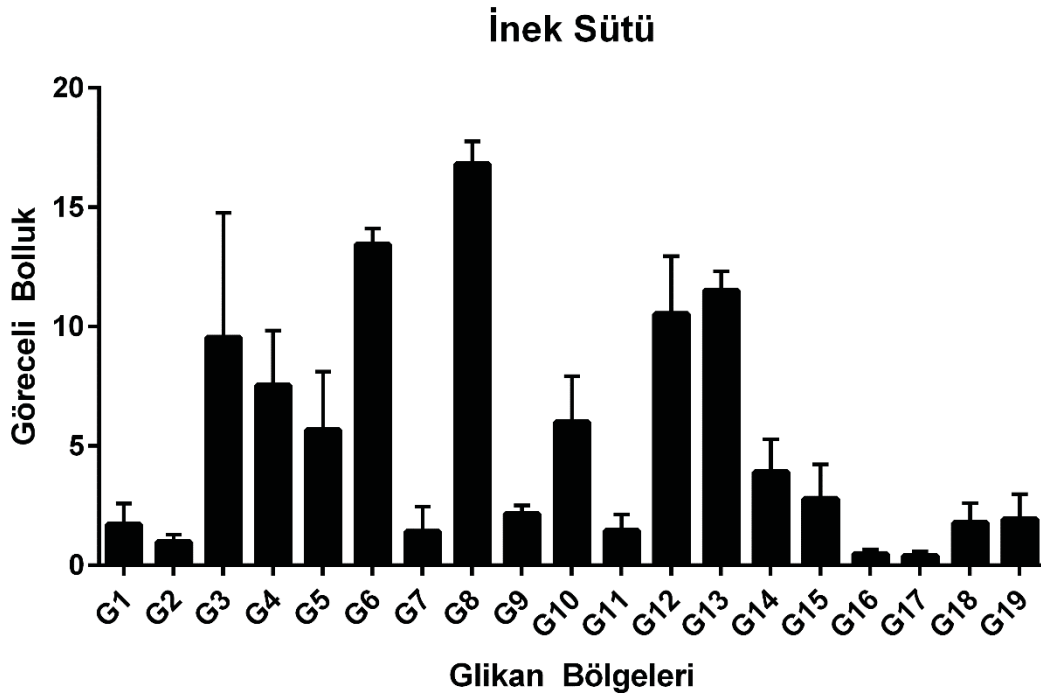
**Şekil 4.6** İnek sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları. \*: serbest süt oligosakkaritine ait pik

Yapılan analizler sonucunda inek sütüne ait 24 N-glikan yapısı MS/MS düzeyinde doğrulanmıştır. MS1 spektrumları dikkate alınarak floresans kromatogramlarındaki alıkonma zamanlar tespit edilmiştir.

**Tablo 4.4** İnek sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları

Bölge	N-glikan Bileşimi	Kütle Bilgisi	m/z ölçülen	m/z hesaplanan	$\Delta$ MH+ [Da]	Rt [dk]	Skor	Sekanslama Yüzdesi [%]	Ortalama Göreceli Bol.	Standart Sapma
G1	Hex4HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	646.7767	646.7844	-0.0152	30.81	36	41	1.70	0.89
G2	Hex3HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	768.8286	768.8373	-0.0175	32.52	92	94	0.97	0.31
	Hex3HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	841.8588	841.8663	-0.0150	34.74	66	51		
G3	Hex3HexNAc5-proc	[2H+](2)-proc=219u	870.3685	870.3770	-0.0170	34.79	82	83	9.54	5.22
	Hex4HexNAc2dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	719.8068	719.8133	-0.0131	35.31	32	39		
	Hex5HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	727.8040	727.8108	-0.0136	37.27	95	101	7.53	2.30
G4	Hex4HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	849.8561	849.8637	-0.0152	37.32	96	110		
	Hex3HexNAc6-proc	[3H+](3)-proc=219u	648.2731	648.2802	-0.0213	38.69	117	147	5.67	2.44
G5	Hex4HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	922.8855	922.8927	-0.0144	39.43	72	59		
	Hex5HexNAc3-proc	[2H+](2)-proc=219u	829.3432	829.3505	-0.0144	39.66	87	83		
	Hex4HexNAc5-proc	[3H+](3)-proc=219u	634.6006	634.6047	-0.0123	40.42	112	137	13.45	0.65
	Hex4HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	922.8846	922.8927	-0.0162	40.08	75	65		
	Hex3HexNAc6dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	696.9597	696.9662	-0.0195	40.68	100	128		
G6	Hex6HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	808.8315	808.8372	-0.0113	41.71	116	148	1.41	1.04
G7	Hex5HexNAc4-proc	[3H+](3)-proc=219u	620.9226	620.9292	-0.0197	42.58	117	150	16.81	0.95
	Hex5HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1003.9104	1003.9191	-0.0174	43.79	75	82	2.16	0.35
G8	Hex5HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1003.9104	1003.9191	-0.0174	44.60	84	79	5.99	1.93
G9	Hex6HexNAc3-proc	[2H+](2)-proc=219u	910.3694	910.3769	-0.0150	44.93	98	107	1.45	0.68
	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	717.9516	717.9610	-0.0282	47.94	94	99	10.53	2.42
G10	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219u	766.9742	766.9832	-0.0271	49.07	70	56	11.51	0.81
G11	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	[3H+](3)-proc=219u	814.9845	814.9928	-0.0249	53.02	91	92	3.91	1.36
	Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	820.3160	820.3244	-0.0253	55.06	77	62		
G12	Hex5HexNAc4NeuGc2-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219u	825.9832	825.9923	-0.0273	55.41	72	65	2.79	1.44
	Hex6HexNAc5NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	888.3511	888.3577	-0.0198	55.88	71	56		
G13	Hex5HexNAc4NeuGc2dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	874.3365	874.3420	-0.0166	56.67	61	41	0.48	0.19
G14	Hex5HexNAc4NeuGc2-proc	[3H+](3)-proc=219u	825.6530	825.6561	-0.0092	57.28	88	84	0.39	0.19
G15	Hex7HexNAc6NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	961.3782	961.3825	-0.0127	58.60	77	73	1.78	0.82
G16	Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219u	1010.3986	1010.4046	-0.0183	59.45	62	45	1.93	1.05

Tablo 4.4'te inek sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları görülmektedir. Çalışmalar neticesinde inek sütü N-glikanları arasında en bol olarak bulunanı H5N4 glikan tipidir. Bu glikan toplam glikan havuzu içerisinde %16,81'i kapsamaktadır. Bu N-glikan tipini sırasıyla %11,51, %10,53 oranlarıyla H5N4F1S1 ve H5N4S1 glikanları takip etmektedir. Veriler incelendiğinde en düşük miktarda bulunan N-glikan yapısı %0,39 oranla H5N4S2 glikanı olarak bulunmuştur. Şekil 4.7'de tespit edilen glikan bölgelerinin göreceli bolluklarını içeren bir grafik görülmektedir.



**Şekil 4.7** İnek sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları

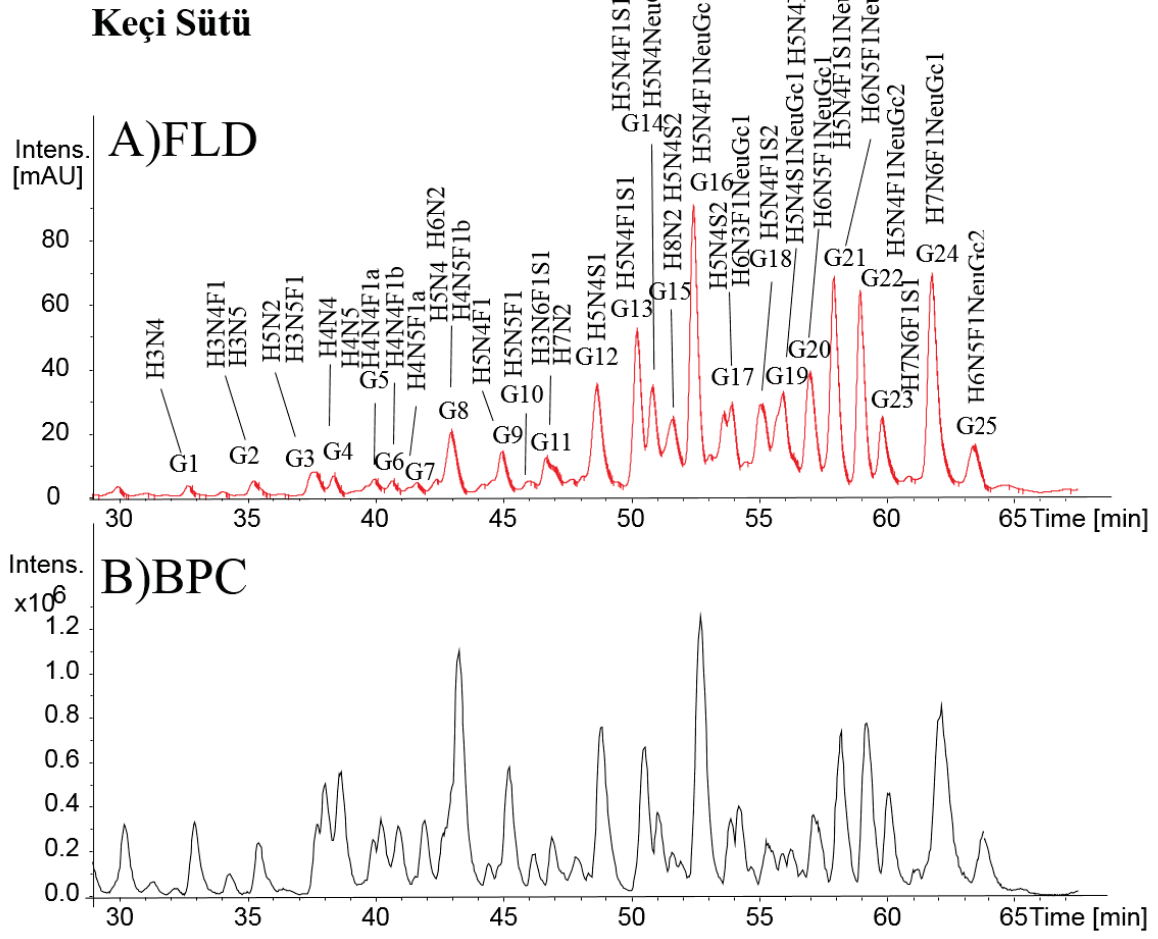
Temel N-glikan grupları incelendiğinde toplam fukoatlanma %47,85 ve toplam siyalik asit içerme oranı ise %33,32 bulunmuştur. Bu değişimleri gösteren grafik tablo 4.5'te görülmektedir.

**Tablo 4.5** İnek sütüne ait toplam fukoatlanma ve siyalillenme oranları

Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk	Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk
<b>Fukoatlanmış</b>		<b>Siyalillenmiş</b>	
Hex3HexNAc4dHex1-proc	9.54	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	10.53
Hex4HexNAc2dHex1-proc		Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	11.51
Hex4HexNAc4dHex1-proc	13.45	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	3.91
Hex4HexNAc4dHex1-proc		Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	2.79
Hex3HexNAc6dHex1-proc		Hex5HexNAc4NeuGc2-proc	
Hex5HexNAc4dHex1-proc	2.16	Hex6HexNAc5NeuAc1dHex1-proc	
Hex5HexNAc4dHex1-proc	5.99	Hex5HexNAc4NeuGc2dHex1-proc	0.48
Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	11.51	Hex5HexNAc4NeuGc2-proc	0.39
Hex6HexNAc5NeuAc1dHex1-proc	2.79	Hex7HexNAc6NeuAc1-proc	1.78
Hex5HexNAc4NeuGc2dHex1-proc	0.48	Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	1.93
Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	1.93		
	<b>47.85</b>		<b>33.32</b>

### 4.3 Keçi Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları

Çalışmada 27 adet keçi sütü eşit hacimlerde karıştırıldıktan sonra whey (gliko)proteinlerinin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalar 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Whey (gliko)proteinlerinin deglikozilasyonu sonucu elde edilen glikan yapıları prokainamid ile etiketlendikten sonra analizleri öncesi pamuk içeren pipet ucu ile saflaştırıldı. Sonrasında etiketlenmiş glikanlar, HPLC-HILIC-FLD-QTOF-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Elde edilen MS/MS spektrumları protein scape yazılımına gönderildikten sonra glikan yapıları belirlendi. Şekil 4.8'de analizler sonucu elde edilen floresans (FLD) ve temel pik kromatogramı (BPC) görülmektedir.



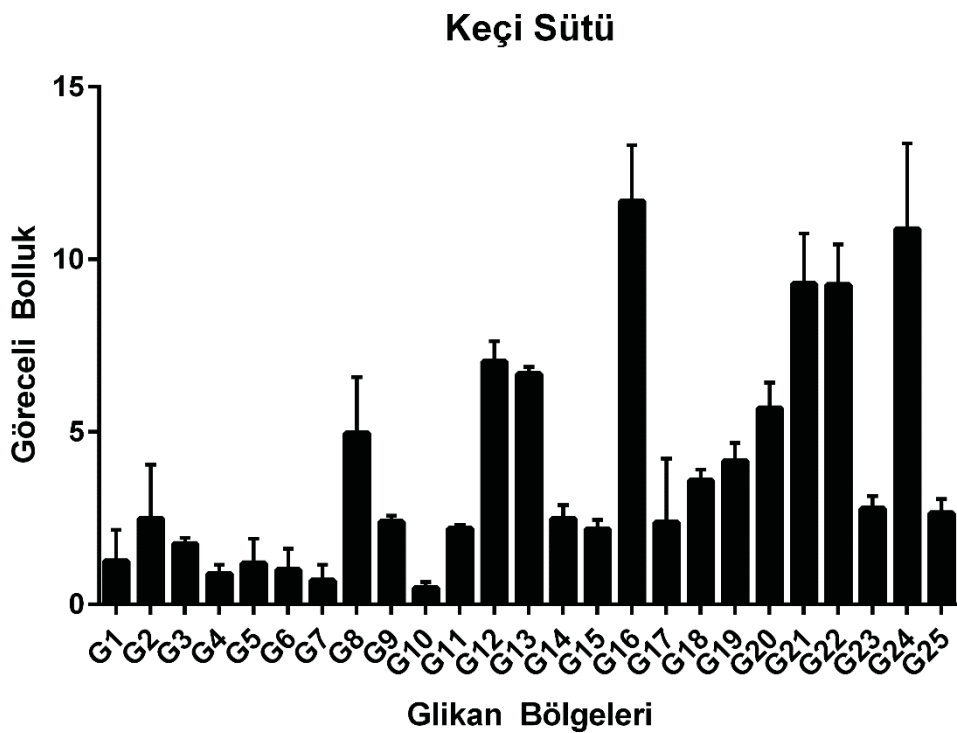
**Şekil 4.8** Keçi sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları

Yapılan analizler sonucunda keçi sütüne ait 30 N-glikan yapısı MS/MS düzeyinde doğrulanmıştır. MS1 spektrumları dikkate alınarak floresans kromatogramlarındaki alıkonma zamanları tespit edilmiştir.

**Tablo 4.6 Keçi sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları**

Bölge	N-glikan Bileşimi	Kütle Bilgisi	m/z ölçülen	m/z hesaplanan	$\Delta$ MH+ [Da]	Rt [dk]	Skor	Sekanslama Yüzdesi [%]	Ortalama Göreceli Bol.	Standart Sapma
G1	Hex3HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	768.8262	768.8373	-0.0223	32.88	40.12	69.12	1.25	0.91
	Hex3HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	841.8518	841.8663	-0.0290	35.96	23.84	29.20	2.49	1.56
	Hex3HexNAc5-proc	[2H+](2)-proc=219u	870.3637	870.3770	-0.0266	35.34	35.18	66.32		
G3	Hex5HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	727.7988	727.8108	-0.0239	37.50	58.46	58.90	1.75	0.18
	Hex3HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	943.3900	943.4060	-0.0320	37.71	22.99	31.39		
G4	Hex4HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	849.8499	849.8637	-0.0277	38.82	45.44	60.23	0.89	0.26
	Hex4HexNAc5-proc	[2H+](2)-proc=219u	951.3837	951.4034	-0.0394	40.55	44.10	55.86	1.19	0.71
G5	Hex4HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	922.8758	922.8927	-0.0337	41.08	27.83	25.35		
	Hex4HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	922.8749	922.8927	-0.0355	41.23	24.71	21.25	1.00	0.61
G7	Hex4HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1024.4127	1024.4324	-0.0393	41.74	28.90	27.46	0.69	0.46
	Hex5HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	930.8722	930.8901	-0.0359	42.18	37.02	71.43		
G8	Hex4HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1024.4138	1024.4324	-0.0371	42.33	27.67	25.13	4.96	1.62
	Hex6HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	808.8238	808.8372	-0.0267	42.47	60.49	81.82		
G9	Hex5HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1003.9017	1003.9191	-0.0349	44.37	29.68	32.54	2.39	0.18
	Hex5HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1105.4425	1105.4588	-0.0325	46.01	39.97	42.79	0.48	0.17
G10	Hex3HexNAc6NeuAcidHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	793.9856	793.9980	-0.0372	46.69	36.45	29.67	2.20	0.10
	Hex7HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	889.8494	889.8636	-0.0284	47.06	49.75	62.75		
G12	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	717.9516	717.9610	-0.0283	48.62	49.30	58.28	7.04	0.59
	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	766.6362	766.6470	-0.0322	50.26	34.44	28.46	6.68	0.20
G14	Hex5HexNAc4NeuGc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	723.2808	723.2926	-0.0354	50.85	47.03	53.59	2.49	0.39
	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	766.6341	766.6470	-0.0386	50.39	29.17	22.13		
G15	Hex8HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	970.8748	970.8900	-0.0305	51.43	59.57	90.08	2.18	0.27
	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	[3H+](3)-proc=219u	814.9810	814.9928	-0.0355	51.66	37.79	33.13	11.69	1.62
G16	Hex5HexNAc4NeuGc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	771.9640	771.9781	-0.0141	52.40	M	M	2.37	1.85
	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	[3H+](3)-proc=219u	814.9791	814.9928	-0.0411	53.68	27.11	34.34	3.59	0.32
G17	Hex6HexNAc3NeuGc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	1136.9279	1136.9502	-0.0223	53.90	M	M	4.16	0.52
	Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	863.6617	863.6783	-0.0166	55.20	M	M	5.68	0.75
G19	Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	820.3072	820.3244	-0.0517	55.74	20.92	24.54		
	Hex5HexNAc4NeuGc2-proc	[3H+](3)-proc=219u	825.6394	825.6561	-0.0501	57.63	24.09	28.65		
G20	Hex6HexNAc5NeuGc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	893.6708	893.6888	-0.0180	56.60	M	M	9.29	1.46
	Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	868.9926	869.0099	-0.0173	56.70	M	M	9.26	1.17
G21	Hex6HexNAc5NeuGc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	893.6708	893.6888	-0.0180	57.00	M	M	2.77	0.37
	Hex5HexNAc4NeuGc2dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	874.3256	874.3415	-0.0159	58.60	M	M	10.88	2.48
G23	Hex7HexNAc6NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	1010.0480	1010.0679	-0.0199	59.60	M	M	2.64	0.41
	Hex7HexNAc6NeuGc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	1015.3802	1015.3995	-0.0193	61.30	M	M		
G25	Hex6HexNAc5NeuGc2dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	996.0337	996.0523	-0.0186	63.10	M	M		

Tablo 4.6'da keçi sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları görülmektedir. Çalışmalar neticesinde keçi sütü N-glikanları arasında en bol olarak bulunan H5N4F1NeuGc1 glikan tipidir. Bu glikan toplam glikan havuzu içerisinde %11,69'yu kapsamaktadır. Bu N-glikan tipini sırasıyla %10,88, %9,29 oranlarıyla H7N6F1NeuGc1 ve H6N5F1NeuGc1 glikanları takip etmektedir. Veriler incelendiğinde en düşük miktarda bulunan N-glikan yapısı %0,48 oranla H5N5F1 glikanı olarak bulunmuştur. Şekil 4.9'da tespit edilen glikan bölgelerinin göreceli bolluklarını içeren bir grafik görülmektedir.



**Şekil 4.9** Keçi sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları

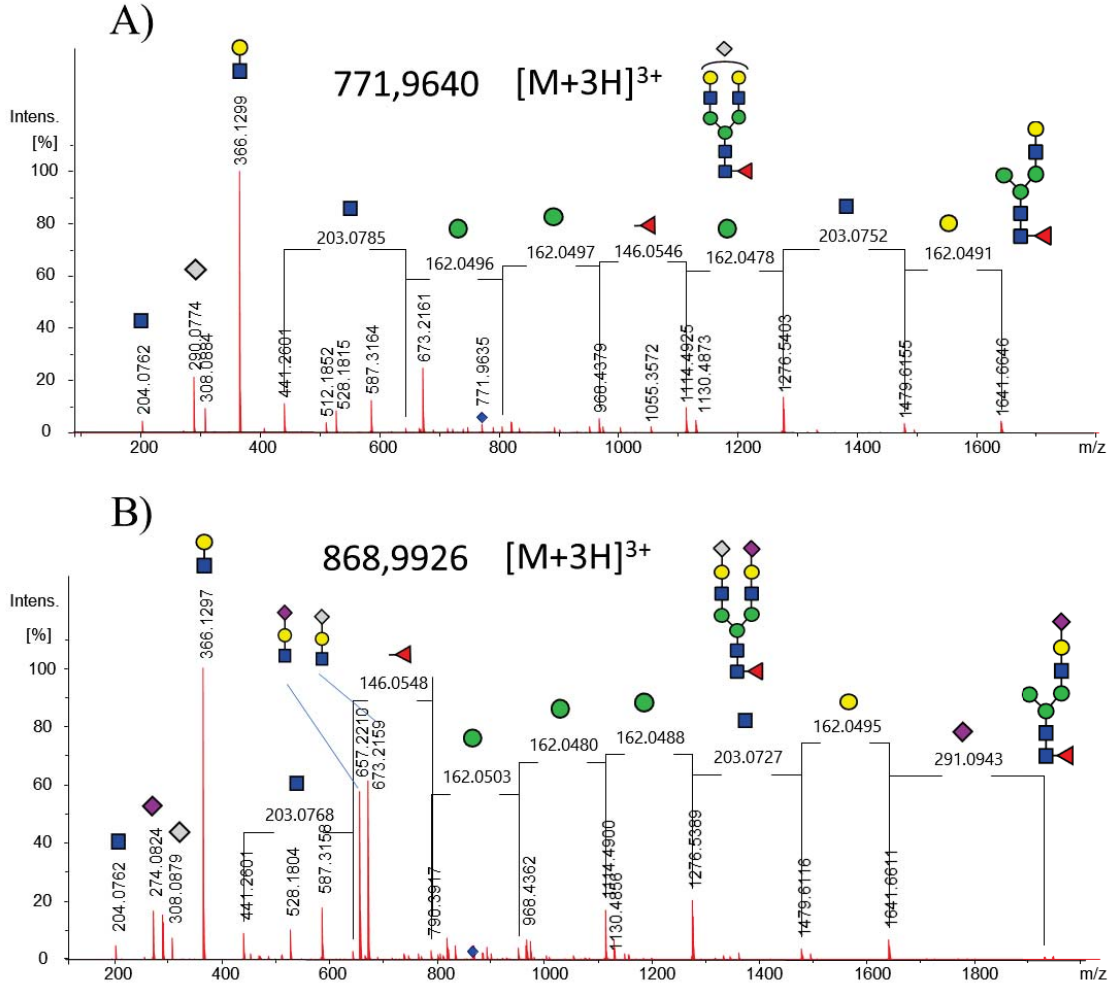
Temel N-glikan grupları incelendiğinde toplam fukozlanma %74,98 ve toplam siyalik asit içerme oranı ise %82,93 bulunmuştur. Bu değişimler tablo 4.7'de görülmektedir.

**Tablo 4.7** Keçi sütüne ait toplam fukoatlanma ve siyalillenme oranları

Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk	Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk
Fukoatlanmış		Siyalillenmiş	
Hex3HexNAc4dHex1-proc	2.49	Hex3HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	2.20
Hex3HexNAc5dHex1-proc	1.75	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	7.04
Hex4HexNAc4dHex1-proc	1.19	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	6.68
Hex4HexNAc4dHex1-proc	1.00	Hex5HexNAc4NeuGc1-proc	2.49
Hex4HexNAc5dHex1-proc	0.69	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	2.18
Hex4HexNAc5dHex1-proc	4.96	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	11.69
Hex5HexNAc4dHex1-proc	2.39	Hex5HexNAc4NeuGc1dHex1-proc	2.37
Hex5HexNAc5dHex1-proc	0.48	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	3.59
Hex3HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	2.20	Hex6HexNAc3NeuGc1dHex1-proc	4.16
Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	6.68	Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	5.68
Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	2.49	Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	9.29
Hex5HexNAc4NeuGc1dHex1-proc	11.69	Hex5HexNAc4NeuGc2-proc	9.26
Hex6HexNAc3NeuGc1dHex1-proc	2.37	Hex6HexNAc5NeuGc1dHex1-proc	2.77
Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	3.59	Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1dHex1-proc	10.88
Hex6HexNAc5NeuGc1dHex1-proc	4.16	Hex6HexNAc5NeuGc1dHex1-proc	2.64
Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1dHex1-proc	5.68	Hex5HexNAc4NeuGc2dHex1-proc	
Hex6HexNAc5NeuGc1dHex1-proc	9.29	Hex7HexNAc6NeuAc1-proc	
Hex6HexNAc5NeuGc1dHex1-proc	9.29	Hex7HexNAc6NeuGc1-proc	
Hex5HexNAc4NeuGc2dHex1-proc	9.26	Hex6HexNAc5NeuGc2dHex1-proc	
Hex6HexNAc5NeuGc2dHex1-proc	2.64		
	74.98		82.93

Keçi sütünün whey glikoproteinlerinin bileşiminde yüksek oranda NeuGc içeren N-glikan yapıları tespit edilmiştir. Bu glikanlara ait MS/MS spektrum örnekleri şekil 4.10'da verilmektedir. NeuGc içeren bir N-glikan yapısının tanısında kullanılan iyonlar 673,230, m/z, [Hex+HexNAc+NeuGc+H]<sup>+</sup> ve 308,098, m/z, [NeuGc+H]<sup>+</sup> parçalanma ürünlerine aittir. NeuAc içeren bir N-glikan yapısının tanısında kullanılan iyonlar ise 657,235, m/z, [Hex+HexNAc+NeuAc+H]<sup>+</sup> ve 292,103, m/z, [NeuAc+H]<sup>+</sup> parçalanma ürünleridir. Şekil 4.10A'daki MS/MS spektrumu incelendiğinde NeuGc içeren glikan yapısını doğrulayan iyonlar gözlenmektedir. Bu iyonların MS/MS spektrumundaki varlığı yapıda NeuGc içeren siyalik asit birimlerinin olduğunu kanıtlamaktadır. Parçalanma ürünleri takip edildiğinde glikan yapısının Hex5HexNAc4NeuGc1dHex1 olduğu belirlenmiştir. Protein Scape yazılımı da bu N-glikan yapısını doğrulamıştır. Şekil 4.10B'de hem NeuGc hem de NeuAc içeren bir N-glikanın MS/MS spektrumu görülmektedir. Buradaki MS/MS spektrumu incelendiğinde her iki siyalik asit yapısını doğrulayan parçalanma ürünleri belirlenmiştir. Parçalanma ürünlerinin takibi ile N-glikan yapısı doğrulanmıştır. Bu N-glikan türü ayrıca Protein Scape yazılımında tespit edilmiştir.

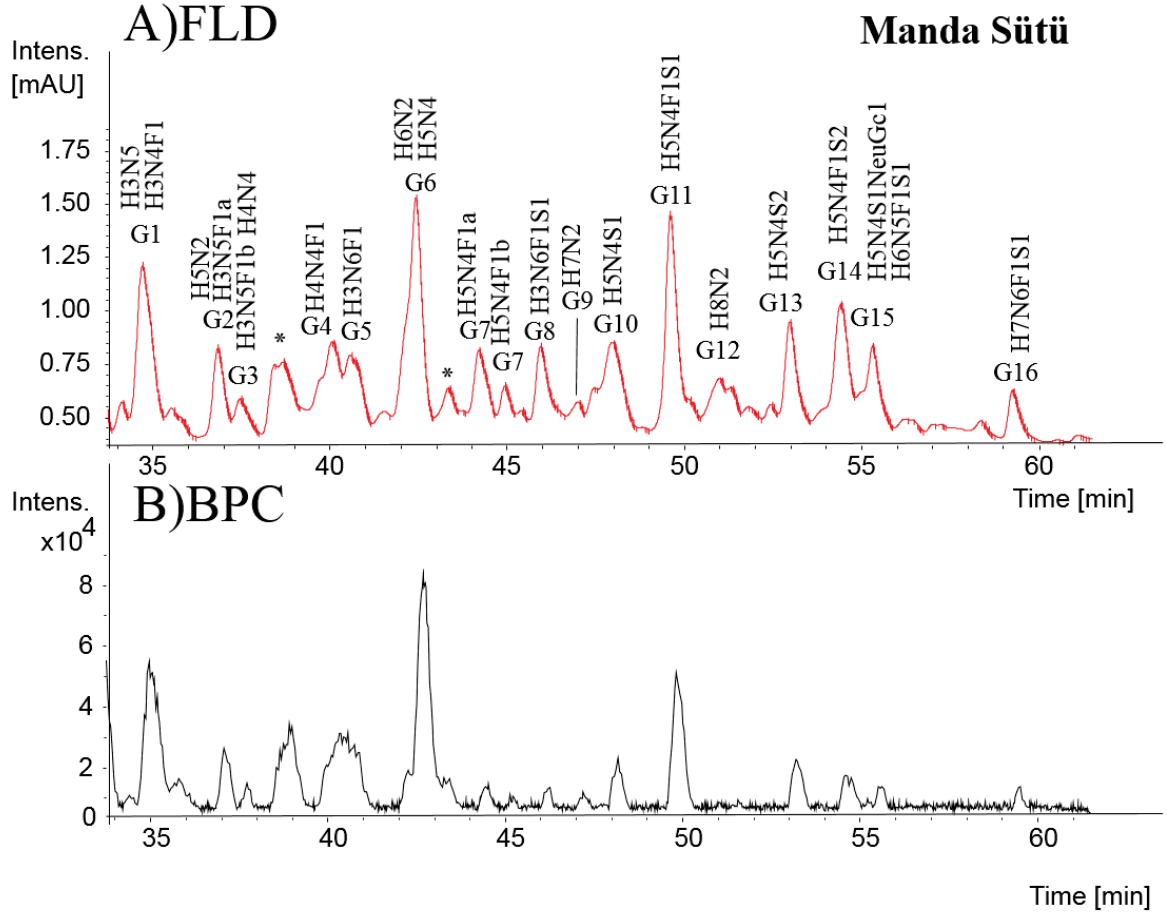




**Şekil 4.10** NeuGc içeren N-glikanların MS/MS spektrumları. A) Tek NeuGc içeren iki antenli bir N-glikan, B) hem NeuGc hem de NeuAc içeren bir N-glikan

#### 4.4 Manda Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları

Çalışmada 10 adet manda sütü eşit hacimlerde karıştırıldıktan sonra whey (gliko)proteinlerinin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalar 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Whey (gliko)proteinlerinin deglikozilasyonu sonucu elde edilen glikan yapıları prokainamid ile etiketlendikten sonra analizleri öncesi pamuk içeren pipet ucu ile saflaştırıldı. Sonrasında etiketlenmiş glikanlar, HPLC-HILIC-FLD-QTOF-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Elde edilen MS/MS spektrumları protein scape yazılımına gönderildikten sonra glikan yapıları belirlendi. Şekil 4.11'de analizler sonucu elde edilen floresans (FLD) ve temel pik kromatogramı (BPC) görülmektedir.



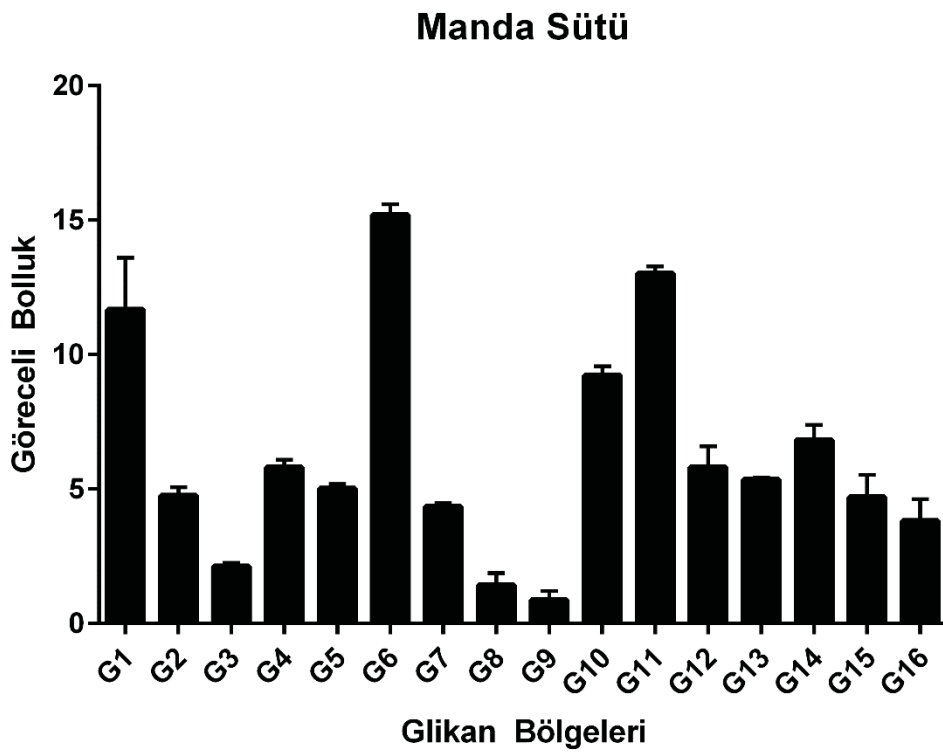
**Şekil 4.11** Manda sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları. \*: serbest süt oligosakkaritine ait pik

Yapılan analizler sonucunda manda sütüne ait 20 N-glikan yapısı MS/MS düzeyinde doğrulanmıştır. MS1 spektrumları dikkate alınarak floresans kromatogramlarındaki alıkonma zamanları tespit edilmiştir.

**Tablo 4.8** Manda sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları

Bölge	N-glikan Bileşimi	Kütle Bilgisi	m/z ölçülen	$y/z$ hesaplanan	MH+ [Da]	Rt [dk]	Skor	Sekanslama Yüzdesi [%]	Ortalama Göreceli Bol.	Standart Sapma
G1	Hex3HexNAc5-proc	[2H+](2)-proc=219u	870.3750	870.3770	-0.0040	34.79	73.1	73	11.67	1.93
	Hex3HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	841.8649	841.8663	-0.0014	34.74	M	M		
G2	Hex5HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	727.8057	727.8108	-0.0102	36.99	76.7	77	4.76	0.31
	Hex3HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	943.3988	943.4060	-0.0143	37.04	66.9	82		
G3	Hex3HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	943.4001	943.4060	-0.0118	37.28	51.5	56	2.12	0.14
	Hex4HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	849.8570	849.8637	-0.0134	38.03	67.2	70		
G4	Hex4HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	922.8856	922.8927	-0.0141	39.75	39.8	32	5.80	0.29
G5	Hex3HexNAc6dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1044.9386	1044.9456	-0.0141	40.80	39.3	23	5.02	0.17
G6	Hex6HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	808.8369	808.8372	-0.0006	42.25	116.1	148	15.20	0.39
	Hex5HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	930.8896	930.8901	-0.0011	42.46	88.8	101		
G7	Hex5HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1003.9167	1003.9191	-0.0048	44.56	65.6	56	4.35	0.12
G8	Hex5HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1003.9200	1003.9191	0.0019	44.72	58.93	44.38	1.44	0.44
	Hex3HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	793.9968	793.9980	-0.0037	46.10	53.8	34		
G9	Hex7HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	889.8611	889.8636	-0.0051	47.10	106.0	121	0.88	0.33
G10	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	717.9579	717.9610	-0.0092	48.11	71.4	69	9.23	0.33
G11	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	766.6423	766.6470	-0.0139	49.68	60.6	48	13.02	0.26
G12	Hex8HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	970.8855	970.8900	-0.0090	51.52	99.1	118	5.82	0.77
G13	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219u	815.3249	815.3290	-0.0125	53.31	68.3	67	5.35	0.07
G14	Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	863.6741	863.6788	-0.0141	54.72	54.6	38	6.83	0.56
G15	Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	820.3230	820.3244	-0.0043	55.19	50.7	30	4.70	0.83
	Hex6HexNAc5NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	888.3534	888.3577	-0.0129	55.44	50.1	32		
G16	Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219u	1010.4007	1010.4046	-0.0118	59.44	48.7	29	3.82	0.81

Tablo 4.8’de manda sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları görülmektedir. alışmalar neticesinde manda sütü N-glikanları arasında en bol olarak bulunanı H6N2 ve H5N4  içeren G6 glikan bölgesidir. Bu glikan toplam glikan havuzu içerisinde %15,2’yi kapsamaktadır. Bu N-glikan tipini sırasıyla %13,02, %11,67 oranlarıyla H5N4S1 ve H3N5, H3N4F1 glikanları takip etmektedir. Veriler incelendiğinde en düşük miktarda bulunan N-glikan yapısı %0,88 oranla H7N2 glikanı olarak bulunmuştur. Şekil 4.12’de tespit edilen glikan bölgelerinin göreceli bolluklarını içeren bir grafik görülmektedir.



**Şekil 4.12** Manda sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları

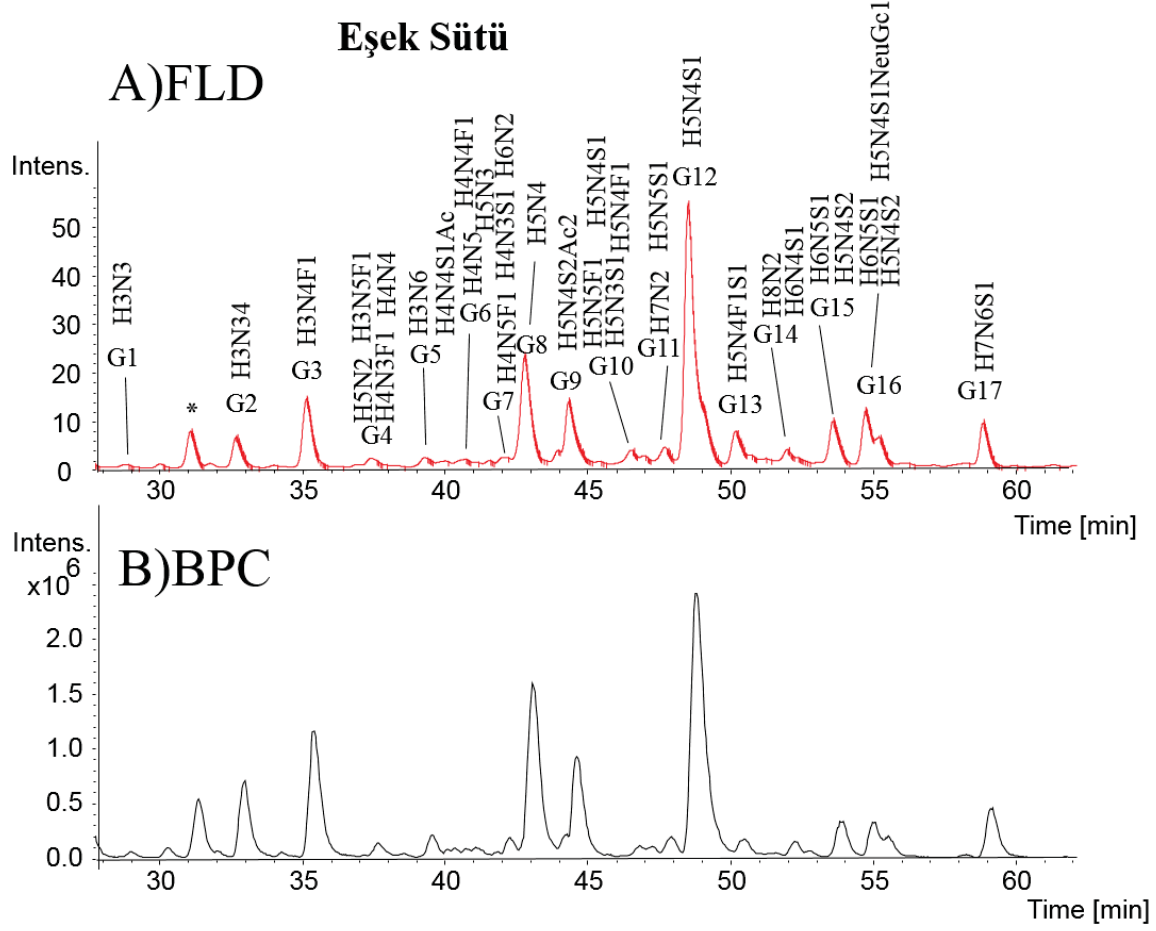
Temel N-glikan grupları incelendiėinde toplam fukoźlanma %50,5 ve toplam siyalik asit içerme oranı ise %44,39 bulunmuřtur. Bu deėiřimler tablo 4.9’da görülmektedir.

**Tablo 4.9** Manda sütüne ait toplam fukozlanma ve siyalillenme oranları

Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk	Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk
Fukozlanmış		Siyalillenmiş	
Hex3HexNAc4dHex1-proc	11.67	Hex3HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	1.44
Hex3HexNAc5dHex1-proc	4.76	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	9.23
Hex3HexNAc5dHex1-proc	2.12	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	13.02
Hex4HexNAc4dHex1-proc	5.80	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	5.35
Hex3HexNAc6dHex1-proc	5.02	Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	6.83
Hex5HexNAc4dHex1-proc	4.35	Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	4.70
Hex5HexNAc4dHex1-proc	1.44	Hex6HexNAc5NeuAc1dHex1-proc	
Hex3HexNAc6NeuAc1dHex1-proc		Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	3.82
Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	6.83		
Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	4.70		
Hex6HexNAc5NeuAc1dHex1-proc			
Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	3.82		
	50.50		44.39

#### 4.5 Eşek Sütü Whey N-glikanlarının Karakterizasyonları

Çalışmada 10 adet eşek sütü eşit hacimlerde karıştırıldıktan sonra whey (gliko)proteinlerinin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalar 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Whey (gliko)proteinlerinin deglikozilasyonu sonucu elde edilen glikan yapıları prokainamid ile etiketlendikten sonra analizleri öncesi pamuk içeren pipet ucu ile saflaştırıldı. Sonrasında etiketlenmiş glikanlar, HPLC-HILIC-FLD-QTOF-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Elde edilen MS/MS spektrumları protein scape yazılımına gönderildikten sonra glikan yapıları belirlendi. Şekil 4.13'te analizler sonucu elde edilen floresans (FLD) ve temel pik kromatogramı (BPC) görülmektedir.



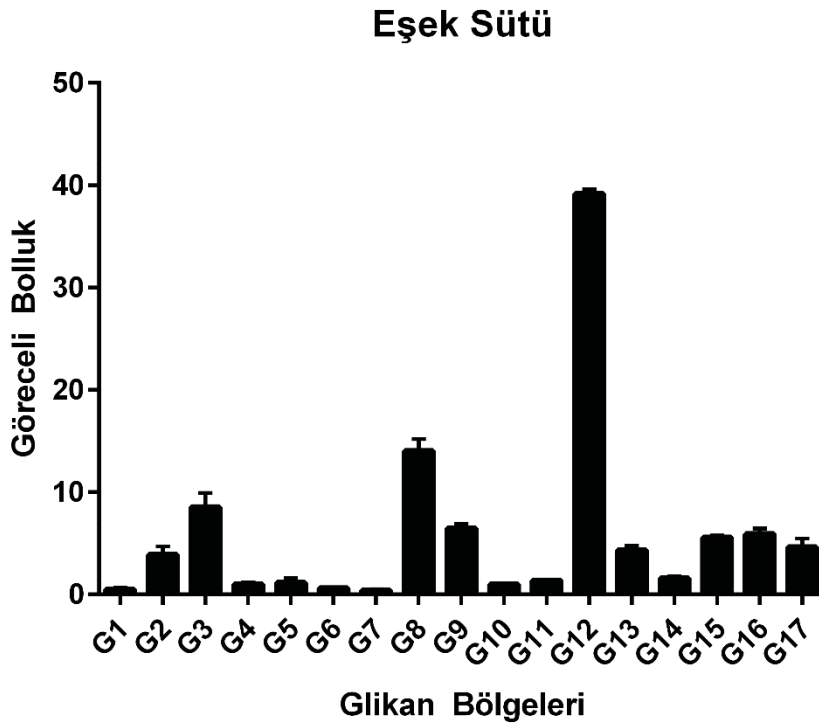
**Şekil 4.13** Eşek sütü whey N-glikanlarına ait A) Floresans B) Temel Pik Kromatogramları. \*: serbest süt oligosakkaritine ait pik

Yapılan analizler sonucunda eşek sütüne ait 29 N-glikan yapısı MS/MS düzeyinde doğrulanmıştır. MS1 spektrumları dikkate alınarak floresans kromatogramlarındaki alıkonma zamanları tespit edilmiştir.

**Tablo 4.10** Eşek sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları

Bölge	N-glikan Bileşimi	Kütle Bilgisi	m/z ölçülen	m/z hesaplanan $\Delta$ MH+	Rt [dk]	Skor	Sekanslama Yüzdesi [%]	Ortalama Göreceli Bol.	Standart Sapma
G1	Hex3HexNAc3-proc	[2H+](2)-proc=219u	667.2971	667.2976	29.14	70.6	57	0.48	0.15
G2	Hex3HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	768.8350	768.8373	32.64	79.6	85	3.86	0.83
G3	Hex3HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	841.8622	841.8663	35.09	65.1	70	8.55	1.36
	Hex5HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	727.8059	727.8108	37.13	53.0	55		
G4	Hex4HexNAc3dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	821.3474	821.3530	37.27	51.6	50	1.00	0.17
	Hex3HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	943.4009	943.4060	37.66	43.2	46		
	Hex4HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	849.8581	849.8637	37.85	83.9	98		
G5	Hex3HexNAc6-proc	[2H+](2)-proc=219u	971.9102	971.9167	39.32	46.9	57	1.15	0.45
	Ac1Hex4HexNAc4NeuAc1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1016.4104	1016.4167	39.72	57.8	60		
	Hex5HexNAc3-proc	[2H+](2)-proc=219u	829.3458	829.3505	40.63	58.7	66		
G6	Hex4HexNAc5-proc	[2H+](2)-proc=219u	951.3956	951.4034	40.87	71.4	91	0.61	0.01
	Hex4HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	922.8861	922.8927	40.87	45.7	37		
	Hex4HexNAc5dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1024.4069	1024.4324	42.13	33.3	44		
G7	Hex4HexNAc3NeuAc1-proc	[2H+](2)-proc=219u	893.8644	893.8717	42.31	57.3	45	0.39	0.14
	Hex6HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	808.8320	808.8372	42.36	109.7	151		
G8	Hex5HexNAc4-proc	[2H+](2)-proc=219u	930.8845	930.8901	42.81	100.9	135	14.03	1.15
G9	Ac2Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	[3H+](3)-proc=219u	842.9960	842.9998	44.30	60.0	48	6.47	0.41
	Hex5HexNAc5dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	737.2948	737.3083	46.22	56.6	54		
G10	Hex5HexNAc4dHex1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1003.9160	1003.9191	46.40	M	M	0.99	0.03
	Hex5HexNAc3NeuAc1-proc	[2H+](2)-proc=219u	974.8949	974.8982	46.48	64.5	52		
	Hex4HexNAc5NeuAc1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1096.9508	1096.9511	46.57	34.5	31		
G11	Hex7HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	889.8629	889.8636	47.52	113.1	135	1.36	0.08
	Hex5HexNAc5NeuAc1-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219	785.9811	785.9903	47.86	56.8	61		
G12	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	[2H+](2)-proc=219u	1076.4348	1076.4378	48.74	70.4	66	39.13	0.46
G13	Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	[3H+](3)-proc=219u	766.6468	766.6470	50.46	52.0	38	4.34	0.44
G14	Hex8HexNAc2-proc	[2H+](2)-proc=219u	970.8789	970.8900	51.92	104.7	143	1.57	0.20
	Hex6HexNAc4NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	771.9757	771.9786	52.58	79.9	81		
G15	Hex6HexNAc5NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	839.6639	839.6717	53.45	63.8	60	5.56	0.20
	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	[3H+](3)-proc=219u	814.9916	814.9928	53.59	77.4	71		
	Hex6HexNAc5NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	839.6706	839.6717	54.36	73.1	73		
G16	Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	[3H+](3)-[1]-proc=219	820.6643	820.6607	54.00	46.8	49	5.89	0.56
	Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	[3H+](3)-proc=219u	814.9907	814.9928	54.28	73.4	67		
G17	Hex7HexNAc6NeuAc1-proc	[3H+](3)-proc=219u	961.3788	961.3825	59.83	73.6	62	4.62	0.85

Tablo 4.10'da eşek sütü N-glikan yapıları, kütle bilgileri, GlycoQuest arama motoru skorları ve her bir N-glikana ait göreceli bolluk miktarları görülmektedir. Çalışmalar neticesinde eşek sütü N-glikanları arasında en bol olarak bulunan H5N4S1 glikan tipidir. Bu glikan toplam glikan havuzu içerisinde %39,13'ü kapsamaktadır. Bu N-glikan tipini sırasıyla %14,03, %8,55 oranlarıyla H5N4 ve H3N4F1 glikanları takip etmektedir. Veriler incelendiğinde en düşük miktarda bulunan N-glikan yapısı %0,39 oranla H4N5F1, H4N3S1, H6N2 glikanları olarak bulunmuştur. Şekil 4.14'te tespit edilen glikan bölgelerinin göreceli bolluklarını içeren bir grafik görülmektedir.



**Şekil 4.14** Eşek sütüne ait glikan bölgelerinin göreceli bollukları

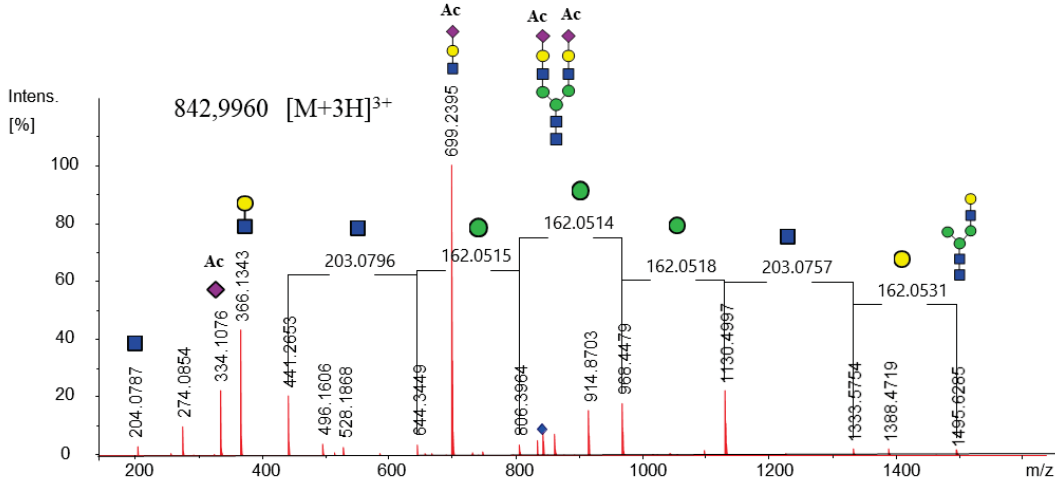
Temel N-glikan grupları incelendiğinde toplam fukozlanma %15,88 ve toplam siyalik asit içerme oranı ise %71,09 bulunmuştur. Bu değişimler tablo 4.11'de görülmektedir.



**Tablo 4.11** Eşek sütüne ait toplam fukozlanma ve siyalillenme oranları

Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk	Glikan Bilgisi	Göreceli Bolluk
<b>Fukozlanmış</b>		<b>Siyalillenmiş</b>	
Hex3HexNAc4dHex1-proc	8.55	Ac1Hex4HexNAc4NeuAc1-proc	1.15
Hex4HexNAc3dHex1-proc	1.00	Ac2Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	6.47
Hex3HexNAc5dHex1-proc		Hex5HexNAc3NeuAc1-proc	0.99
Hex4HexNAc4dHex1-proc	0.61	Hex4HexNAc5NeuAc1-proc	
Hex4HexNAc5dHex1-proc	0.39	Hex5HexNAc5NeuAc1-proc	1.36
Hex5HexNAc5dHex1-proc	0.99	Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	39.13
Hex5HexNAc4dHex1-proc		Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	4.34
Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	4.34	Hex6HexNAc4NeuAc1-proc	1.57
		Hex6HexNAc5NeuAc1-proc	5.56
		Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	
		Hex6HexNAc5NeuAc1-proc	5.89
		Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	
		Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	
		Hex7HexNAc6NeuAc1-proc	4.62
	15.88		71.09

Diğer süt türlerinden farklı olarak eşek sütünde O-asetillenmiş siyalik asit içeren N-glikan yapıları tespit edilmiştir. Şekil 4.15'te H5N4S2 glikan yapısına ait bir MS/MS spektrumu görülmektedir. Spektrum incelendiğinde siyalik asit içeren parçalanma ürünlerinin asetillendiği (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sup>-</sup>, 42 Da) görülmektedir. Siyalik asit parçalanma ürünlerini içeren iyonlar 334,107, m/z, [NeuAc+Ac+H]<sup>+</sup> ve 699,239, m/z, [Hex+HexNAc+NeuAc+Ac+H]<sup>+</sup> spektrumda tespit edilmiştir. Bu iyonlar, siyalik asit birimlerinin asetillendiğini göstermektedir. Bu iyonlar, literatürde asetillenmiş siyalik asit içeren glikopeptit analizlerinde de gözlemlenmiştir [78].



**Şekil 4.15** O-asetillenmiş siyalik asit içeren iki antenli disiyalile N-glikanın (H5N4S2) MS/MS spektrumu

Tespit edilen öncül iyonun kütlesi ve parçalanma iyonları incelendiğinde bu N-glikan iki adet O-asetillenmiş siyalik asit içeren iki antenli bir N-glikan yapısına sahip olduğu belirlendi. Burada bahsedilen N-glikan yapıları Protein Scape yazılımında da otomatik olarak bulunmuştur.

#### 4.6 Türler Arası Whey N-glikan tiplerinin Karşılaştırılması

Tez kapsamında beş farklı türe ait süt whey N-glikan yapıları aydınlatılmış ve her bir tespit edilen glikan bölgesinin göreceli bolluğu hesaplanmıştır. Türler arası ilk kıyaslama glikan tipleri üzerine gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.12'de tüm tespit edilen glikan tipleri ve türlere göre bulunma durumları görülmektedir. Tablo 4.12'den görüleceği üzere anne sütü N-glikan tipleri ile en fazla glikanı örtüşen tür keçi ve eşek olarak belirlenmiştir. Anne sütü hariç tüm türlerde Neu5Gc tipli siyalik asit içeren N-glikan yapıları tespit edilmiştir. Bu N-glikan yapısının tanı parçalanma iyonları tespit edilen tüm MS/MS spektrumlarında tarandığında bu parçalanma ürününe ait pikler belirlenememiştir. Neu5Gc tipli N-glikan yapıları keçi sütünde yoğunlukla tespit edilmiştir. Her bir tür için tespit edilen N-glikanlar türler arasında kıyaslandığında manda sütü hariç her bir türün sadece kendisinde bulunan bazı glikan tipleri vardır. Sadece inek sütünde H4N2 ve H4N2F1; eşek sütünde H3N3, H4N3F1, H6N4S1, AcH4N4S1, AcH5N4S2, H5N3S1, H4N5S1, H5N5S1; keçi sütünde H5N4NeuGc1, H5N4F1NeuGc1, H6N3F1NeuGc1, H6N5F1NeuGc1, H6N5F1NeuGc2; anne sütünde ise H4N4S1, H4N3F1S1, H6N3S1, H6N5S1,

H5N5F1S1, H5N5F1S2, H6N5S2, H6N5F1S2, H6N5S3 ve H6N5F1S3 glikanları bulunmaktadır. Bunların yanı sıra H6N2, H4N4F1, H5N4F1, H5N4S1, H5N4F1S1 ve H5N4F1S2 glikanlarının tüm sütlerde ortak olarak bulunduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4.12** Süt türlerine göre belirlenen tüm glikanların benzerlik ve farklılıkları

N-glikan Bileşimi	İnsan	İnek	Keçi	Manda	Eşek
Hex3HexNAc5dHex1-proc	+	-	+	+	+
Hex5HexNAc3-proc	+	+	-	-	+
Hex4HexNAc5-proc	+	+	+	-	+
Hex4HexNAc4dHex1-proc	+	+	+	+	+
Hex4HexNAc5dHex1-proc	+	-	+	-	+
Hex4HexNAc3NeuAc1-proc	+	-	-	-	+
Hex6HexNAc2-proc	+	+	+	+	+
Hex5HexNAc4dHex1-proc	+	+	+	+	-
Hex4HexNAc4NeuAc1-proc	+	-	-	-	-
Hex4HexNAc3NeuAc1dHex1-proc	+	-	-	-	-
Hex5HexNAc5dHex1-proc	+	-	+	-	+
Hex4HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	+	-	-	-	-
Hex7HexNAc2-proc	+	-	+	+	+
Hex5HexNAc4NeuAc1-proc	+	+	+	+	+
Hex6HexNAc3NeuAc1-proc	+	-	-	-	-
Hex6HexNAc5dHex1-proc	+	-	-	-	-
Hex5HexNAc5NeuAc1dHex1-proc	+	-	-	-	-
Hex8HexNAc2-proc	+	-	+	+	+
Hex5HexNAc4NeuAc1dHex1-proc	+	+	+	+	+
Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	+	+	+	+	+
Hex5HexNAc4NeuAc2dHex1-proc	+	-	+	+	-
Hex5HexNAc5NeuAc2dHex1-proc	+	-	-	-	-
Hex6HexNAc5NeuAc2-proc	+	-	-	-	-
Hex6HexNAc5NeuAc2dHex1-proc	+	-	-	-	-
Hex7HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	+	+	-	+	-
Hex6HexNAc5NeuAc3-proc	+	-	-	-	-
Hex6HexNAc5NeuAc3dHex1-proc	+	-	-	-	-
Hex4HexNAc2-proc	-	+	-	-	-
Hex3HexNAc4-proc	-	+	+	-	+
Hex3HexNAc4dHex1-proc	-	+	+	+	+
Hex3HexNAc5-proc	-	+	+	+	-
Hex4HexNAc2dHex1-proc	-	+	-	-	-
Hex5HexNAc2-proc	-	+	+	+	+
Hex4HexNAc4-proc	-	+	+	+	+
Hex3HexNAc6-proc	-	+	-	-	+
Hex3HexNAc6dHex1-proc	-	+	-	+	-
Hex5HexNAc4-proc	-	+	+	+	+
Hex6HexNAc3-proc	-	+	-	-	-

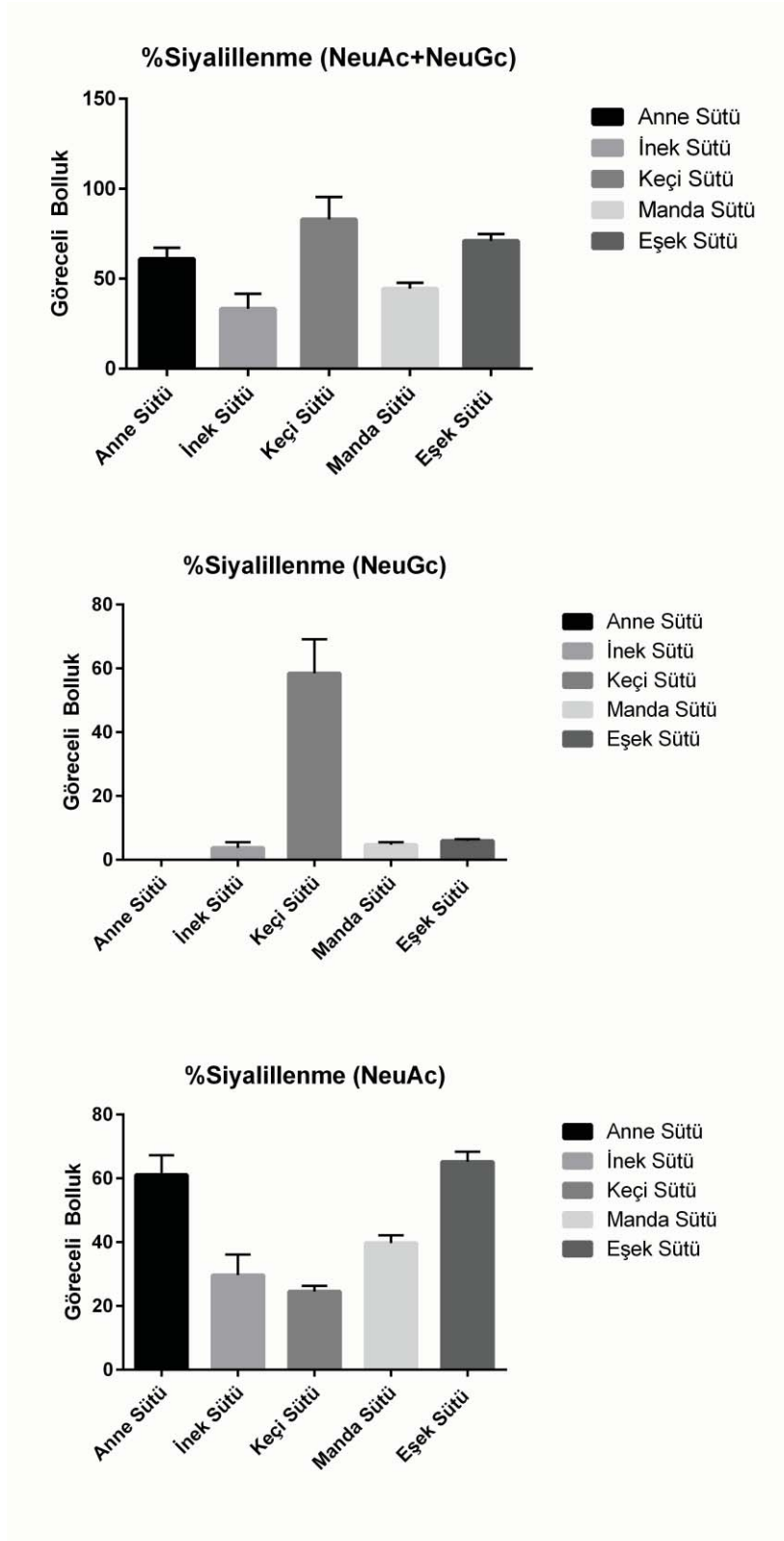
Hex5HexNAc4NeuAc1NeuGc1-proc	-	+	+	+	+
Hex6HexNAc5NeuAc1dHex1-proc	-	+	-	+	-
Hex5HexNAc4NeuGc2dHex1-proc	-	+	+	-	-
Hex7HexNAc6NeuAc1-proc	-	+	+	-	+
Hex3HexNAc6NeuAc1dHex1-proc	-	-	+	+	-
Hex5HexNAc4NeuGc1-proc	-	-	+	-	-
Hex5HexNAc4NeuGc1dHex1-proc	-	-	+	-	-
Hex6HexNAc3NeuGc1dHex1-proc	-	-	+	-	-
Hex6HexNAc5NeuGc1dHex1-proc	-	-	+	-	-
Hex6HexNAc5NeuGc2dHex1-proc	-	-	+	-	-
Hex5HexNAc4NeuGc2-proc	-	+	+	-	-
Hex7HexNAc6NeuGc1-proc	-	-	+	-	-
Hex3HexNAc3-proc	-	-	-	-	+
Hex4HexNAc3dHex1-proc	-	-	-	-	+
Hex6HexNAc4NeuAc1-proc	-	-	-	-	+
Ac1Hex4HexNAc4NeuAc1-proc	-	-	-	-	+
Ac2Hex5HexNAc4NeuAc2-proc	-	-	-	-	+
Hex5HexNAc3NeuAc1-proc	-	-	-	-	+
Hex4HexNAc5NeuAc1-proc	-	-	-	-	+
Hex5HexNAc5NeuAc1-proc	-	-	-	-	+

#### 4.7 Glikozilasyon Gruplarının Karşılaştırılması

Türler için tespit edilen her bir N-glikan bölgesi özelliklerine göre sınıflandırılmış ve o özelliğin göreceli bolluğu hesaplanmıştır. Bu tez kapsamında % siyalillenme ve % fukozlanma oranlarına odaklanılmış ve türler, bu N-glikan özelliklerine göre kendi N-glikan havuzu içerisinde sınıflandırılmıştır.

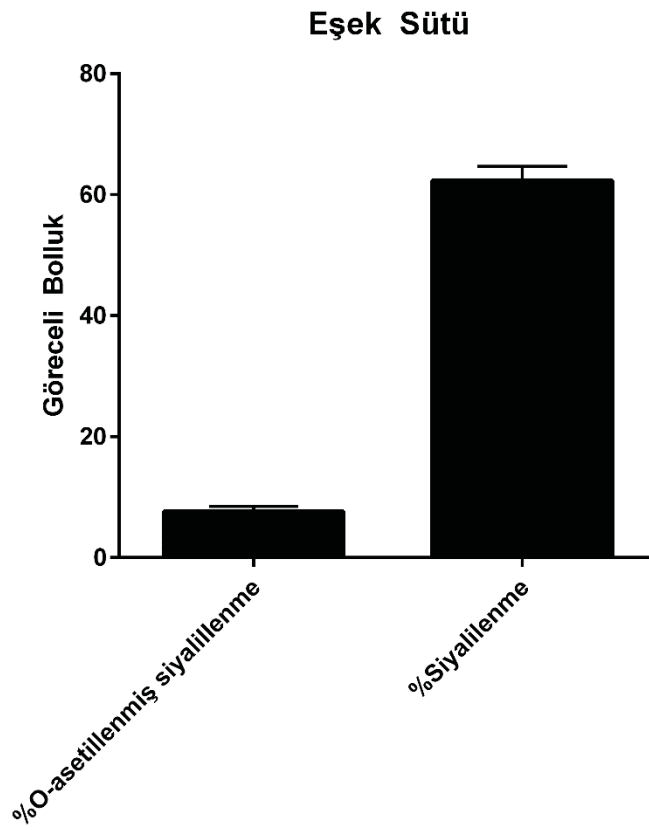
Siyalik asit içerme oranları kıyaslandığında keçi sütünün yüksek oranda siyalik asit içerdiği belirlenmiştir (%82,93, Şekil 4.16A). Bu oranın yüksek bir kısmını NeuGc tipli glikanlar oluşturmaktadır (%58,45, Şekil 4.16B). Türler arasındaki kıyaslamalar yapıldığında %siyalillenme oranının keçi>eşek>anne>manda>inek sütü doğrultusunda olduğu belirlenmiştir. NeuGc bakımından göreceli bollukların kıyaslanmasında ise keçi>eşek>manda>inek doğrultusunda bir dağılımın olduğu belirlenmiştir. Anne sütünde bu tipte bir N-glikan yapısı tespit edilmemiştir. Bu beklenen bir durumdur, çünkü insanda bu siyalik asit tipinin üretiminden sorumlu gen mutasyona uğramıştır ve dolayısıyla üretilemez [79]. Fakat, yapılan çalışmalarda insan dokularında da Neu5Gc tipli N-glikanların varlığı tespit edilmiştir. Bu durumun insan diyetinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu birikimin özellikle kanser dokularında arttığı bildirilmektedir [80]. Diğer yandan

kırmızı et türlerinde de yüksek oranda bulunduğu bilinen bu siyalik asit tipinin enflamasyonu ve kanser oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir [81].



Şekil 4.16 Türler arası % siyalillenme oranlarının kıyaslanması

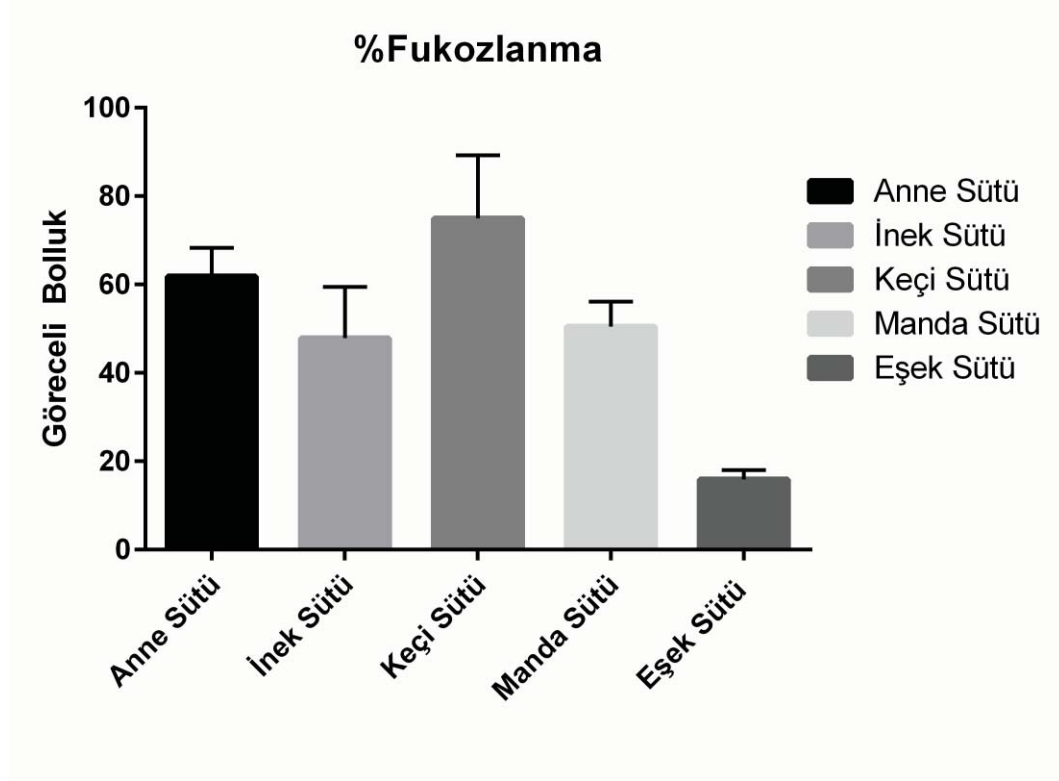
Diğer türlerden ayrı olarak sadece eşek sütü whey glikoproteomunda O-asetillenmiş N-glikan tipleri belirlenmiştir (%7,62, Şekil 4.17). Asetillenmiş siyalik asit içeren N-glikanlar siyalik asit içeren N-glikanların yaklaşık %10'nu kapsamaktadır. O-asetillenme siyalik asitlerin en yaygın modifikasyonlarından birisidir [82]. Siyalik asitlerin asetilasyonun, kanser ve viral enfeksiyonlar gibi birçok biyolojik ve patolojik sürece dahil olduğu bilgisine literatürde yer verilmiştir [83-84]. İnsan kolonik münislerinde bulunan siyalik asitlerin %50'sinden fazlası O-asetillenmiştir [85]. Ve de O-asetillenmiş siyalik asitlerinin azalması koleraktal kanserin ilerlemesiyle ilgili önemli bir değişiklik olarak belirtilmiştir [86].



**Şekil 4.17** Eşek sütünde tespit edilen O-asetillenmiş siyalillenme oranı

Fukozlanma N-glikanların aktivitesinde önemli roller oynayan önemli bir glikan özelliğidir. Anne ve inek sütünün kıyaslandığı bir çalışmada anne sütünün inek sütüne kıyasla daha yüksek anti-patojenik özelliği olduğu vurgulanmaktadır ve fukozlanmanın sütlerin anti-patojenik etkisinde anahtar rol aldığı belirlenmiştir [87]. Bu nedenle, türler arasında bu tarz kapsamlı analizlerin yapılması oldukça

önemlidir. Fukozlanma miktarları da çalışmada kıyaslanmıştır. Şekil 4.18'de türlerin fukozlanma bakımından dağılımları görülmektedir. Fukozlanma olarak en yüksek bolluğa sahip tür keçi sütü olarak belirlenmiştir (%74,98). Keçi sütünü sırasıyla anne, manda, inek ve eşek sütü takip etmektedir.



**Şekil 4.18** Süt türleri arası % fukozlanma oranlarının kıyaslanması

Çeşitli süt türlerinde yapılan çalışmalara bakıldığında, Lebrilla ve ark. [88] anne sütü whey proteinlerinin N-glikanlarında %75 oranında fukozlanma, %57 oranında siyalillenme; inek sütü için ise sırasıyla %31 ve %68 oranında fukozlanma ve siyalillenme olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise anne sütü whey proteinlerindeki N-glikanların %53'ünde fukozlanma, %39'unda ise siyalillenme olduğu belirlenmiştir. İnek sütü için ise fukozlanma ve siyalillenme için bu değerler sırasıyla %52 ve %59'dur [89]. Eşek ve manda sütü için ise kıyaslanmanın yapılabileceği herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Sonuçlarda oluşan farklılıklar, yapılan analizlerin yanısıra, toplanılmış olan süt örneklerinin bulunduğu bölgelere, türlerin beslenme tipine ve sütün alınma zamanına bağlı olarak değişiklik gösterebilir.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında çeşitli türlere ait sütlerin whey glikoproteomlarının N-glikan profillerinin kıyaslanması HPLC-HILIC-FLD-QTOF-MS/MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

- Anne, inek, keçi, manda ve eşek için sırasıyla 27, 24, 30, 20 ve 29 adet MS/MS düzeyinde N-glikan yapısı tespit edilmiştir.
- Anne, inek, keçi, manda ve eşek için sırasıyla en bol N-glikan türleri H5N4S1, H5N4, H5N4F1NeuGc1, H6N2/H5N4 ve H5N4S1 olarak belirlenmiştir.
- H6N2, H4N4F1, H5N4F1, H5N4S1, H5N4F1S1 ve H5N4F1S2 glikanlarının tüm sütlerde ortak olarak bulunduğu belirlenmiştir.
- Anne sütü N-glikan tipleri ile en fazla glikanı örtüşen tür keçi ve eşek olarak belirlenmiştir.
- NeuGc tipli siyalik asit içeren N-glikanlar anne sütü hariç diğer sütlerde tespit edilmiştir.
- Keçi sütünde NeuGc tipli siyalik asit içeren N-glikanların kendi glikan havuzu içerisinde en bol bulunduğu belirlenmiştir.
- Siyalillenme oranına göre en fazla siyalik asit içeren N-glikan tiplerinin keçi sütünde olduğu belirlenmiştir. Bu dağılımı sırasıyla eşek, insan, manda, inek türlerinin izlediği belirlenmiştir.
- O-asetillenmiş siyalik asit içeren N-glikan yapıları sadece eşek sütünde tespit edilmiştir ve toplam siyalillenme oranının yaklaşık %10'nu kapsamakta olduğu belirlenmiştir.



- Fukozlanma bakımından değerlendirildiğinde ise keçi ve anne süt whey glikomlarının yüksek oranda fukozlandığı belirlenmiştir.
- Eşek ve manda sütlerinin N-glikan analizleri ilk defa yapılmıştır.
- Çalışmada kullanılmış olan 5 süt türü ilk defa aynı yöntem ve cihaz kullanılarak karşılaştırılmıştır.
- Süt proteinlerinin N-glikan yapısının belirlenmesinde prokainamid ile etiketleme ve HILIC-FLD-QTOF-MS/MS yöntemi kullanılarak güçlü bir biyoanalitik yöntem geliştirilmifitir.

## KAYNAKLAR

- [1] Y. L. Deribe, T. Pawson, and I. Dikic, "Post-translational modifications in signal integration," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 666–672, 2010.
- [2] O. Nørregaard Jensen, "Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 33–41, 2004.
- [3] J. Seo and K. Lee, "Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches," vol. 37, no. 1, pp. 35–44, 2004.
- [4] R. Kornfeld and S. Kornfeld, "Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides" *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 54, no. 1, pp. 631–664, 1985.
- [5] R. A. Dwek, "Glycobiology: 'Towards understanding the function of sugars,'" *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–25, 1995.
- [6] K. Ohtsubo and J. D. Marth, "Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease," *Cell*, vol. 126, no. 5, pp. 855–867, 2006.
- [7] C. H. Wong, "Protein glycosylation: New challenges and opportunities," *J. Org. Chem.*, vol. 70, no. 11, pp. 4219–4225, 2005.
- [8] J. Balzarini, "Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins," *Antiviral Res.*, vol. 71, no. 2-3 SPEC. ISS., pp. 237–247, 2006.
- [9] M. Butler *et al.*, "Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis," *Glycobiology*, vol. 13, no. 9, pp. 601–622, 2003.
- [10] D. H. Dube and C. R. Bertozzi, "Glycans in cancer and inflammation - Potential for therapeutics and diagnostics," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 6, pp. 477–488, 2005.
- [11] M. M. Fuster and J. D. Esko, "The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 7, pp. 526–542, 2005.
- [12] C. T. Campbell and K. J. Yarema, "Large-scale approaches for glycobiology," *Genome Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1–8, 2005.
- [13] P. Zhang *et al.*, "Challenges of glycosylation analysis and control: An integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 5, pp. 740–765, 2016.
- [14] M. Hedlund *et al.*, "N-Glycolylneuraminic Acid Deficiency in Mice: Implications for Human Biology and Evolution," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 12, pp. 4340–4346, 2007.

- [15] M. Bardor, D. H. Nguyen, S. Diaz, and A. Varki, "Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 6, pp. 4228–4237, 2005.
- [16] P. Tangvoranuntakul *et al.*, "Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 21, pp. 12045–12050, 2003.
- [17] A. Kobata, "Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins," *Eur. J. Biochem.*, vol. 209, no. 2, pp. 483–501, 1992.
- [18] K. P. Willey, "An elusive role for glycosylation in the structure and function of reproductive hormones," *Hum. Reprod. Update*, vol. 5, no. 4, pp. 330–355, 1999.
- [19] W. Morelle, K. Canis, F. Chirat, V. Faid, and J. C. Michalski, "The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation.," *Proteomics*, vol. 6, no. 14, pp. 3993–4015, 2006.
- [20] K. Maass, R. Ranzinger, H. Geyer, C. W. Von Der Lieth, and R. Geyer, "Glyco-peakfinder'-De novo composition analysis of glycoconjugates," *Proteomics*, vol. 7, no. 24, pp. 4435–4444, 2007.
- [21] W. H. Taylor and J. D. Esko, "Carbohydrates and glycobiology.," vol. 291, no. March, 2001.
- [22] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, and R. A. Dwek, "Glycosylation and the immune system," *Science (80-. )*, vol. 291, no. 5512, pp. 2370–2376, 2001.
- [23] S. M. Southall, P. J. Simpson, H. J. Gilbert, G. Williamson, and M. P. Williamson, "The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch," *FEBS Lett.*, vol. 447, no. 1, pp. 58–60, 1999.
- [24] H. M. Florman and P. M. Wassarman, "O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity," *Cell*, vol. 41, no. 1, pp. 313–324, 1985.
- [25] S. Holst, M. Wuhrer, and Y. Rombouts, *Glycosylation characteristics of colorectal cancer*, 1st ed., vol. 126. Elsevier Inc., 2015.
- [26] S. S. Pinho and C. A. Reis, "Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 15, no. 9, pp. 540–555, 2015.
- [27] B. Adamczyk, T. Tharmalingam, and P. M. Rudd, "Glycans as cancer biomarkers," *Biochim. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1820, no. 9, pp. 1347–1353, 2012.
- [28] M. Hamosh, "Protective Function of Proteins and Lipids in Human Milk," vol. 20007, pp. 163–176, 1998.
- [29] T. Gardiner, J. C. Garriott, A. Johnson-zeiger, J. Ramberg, "The Benefits Throughout Life of Breastfeeding with Emphasis on the Role of Glycoconjugates

Milk is Life,” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.*, vol.30, pp. S8-S17, 2000.

[30] D. S. Newburg and W. A. Walker, “Protection of the Neonate by the Innate Immune System of Developing Gut and of Human Milk,” vol. 61, no. 1, pp. 2–8, 2007.

[31] Y. Liao, R. Alvarado, B. Phinney, and L. Bo, “Proteomic Characterization of Human Milk Whey Proteins during a Twelve-Month Lactation Period,” pp. 1746–1754, 2011.

[32] A. Le, L. D. Barton, J. T. Sanders, and Q. Zhang, “Exploration of Bovine Milk Proteome in Colostral and Mature Whey Using an Ion-Exchange Approach research articles,” pp. 692–704, 2011.

[33] R. Apweiler, “On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database 1,” vol. 1473, pp. 4–8, 1999.

[34] An HJ, Froehlich JW, Lebrilla CB. “Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins, ” *Current Opinion Chemical Biology.*, vol. 13(4), pp. 421–426, 2009.

[35] F. Jirillo, E. Jirillo, and T. Magrone, “Donkey’s and Goat’s Milk Consumption and Benefits to Human Health with Special Reference to the Inflammatory Status,” pp. 859–863, 2010.

[36] F. Nazzaro, P. Orlando, F. Fratianni, and R. Coppola, “Isolation of Components with Antimicrobial Property from the Donkey Milk: A Preliminary Study,” no. July, pp. 15–20, 2016.

[37] F. Tidona *et al.*, “Antimicrobial effect of donkeys ’ milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes,” *Int. Dairy J.*, vol. 21, no. 3, pp. 158–165, 2011.

[38] B. M. Sari, A. I. Mandi, A. M. Torbica, J. M. Tomi, and Đ. C. G. Okanovi, “Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys ’ milk c,” vol. 25, pp. 142–146, 2012.

[39] D. Brumini *et al.*, “Antiviral activity of donkey milk protein fractions on echovirus type 5,” *Int. Dairy J.*, vol. 28, no. 2, pp. 109–111, 2013.

[40] A. Gustafsson, I. Kacs Kovics, M. E. Breimer, and L. Hammarstr, “Carbohydrate phenotyping of human and animal milk glycoproteins,” pp. 109–118, 2005.

[41] R.Jensen, *Handbook of Milk Composition*, “Carbohydrates in Milks: Analysis Quantities and Significance”, S. H. Neubauer, Chapter 4,1995.

[42] K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Shin, and M. Takase, “Bovine lactoferrin : benefits and mechanism of action against infections,” vol. 296, pp. 291–296, 2006.

[43] M. C. Harmsen, P. J. Swart, R. Pauwels, and D. K. F. Meijer, “Antiviral Effects of Plasma and Milk Proteins : Lactoferrin Shows Potent Activity against

Both Human Immunodeficiency Virus and Human Cytomegalovirus Replication In Vitro.” vol.18 no. 2, pp. 76-83, 2001.

[44] E. Bertino *et al.*, “Efficacy of donkey’s milk in treating highly problematic cow’s milk allergic children: An in vivo and in vitro study” *Pediatric Allergy and Immunology*, vol.18, pp. 258-264, 2007.

[45] F. Cresi, P. A. Tovo, G. E. Moro, A. Conti, “Tolerability of donkeys ’ milk in 92 highly-problematic cows’ milk allergic children,” pp. 75-82, 2012.

[46] K. M. Ja, “Mammalian milk allergy : clinical suspicion , cross-reactivities and diagnosis,” 2009.

[47] X. Zhang, L. Zhao, L. Jiang, M. Dong, and F. Ren, “The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage,” vol. 19, pp. 1191–1195, 2008.

[48] J. Jolles *et al.*, “Human lactotransferrin : amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins,” vol. 676, pp. 659–676, 1984.

[49] S. Karav, J. B. German, C. Rouqui, A. Le Parc, and D. Barile, “Studying Lactoferrin N -Glycosylation,” pp. 1–15, 2017.

[50] P. F. Levay and M. Viljoen, “Lactoferrin : A General Review,” pp. 252–267, 1995.

[51] J. Steijns, “Milk ingredients as nutraceuticals,” vol. 54, no. 3, pp. 81–88, 2001.

[52] Y. Hirai *et al.*, “of Lactoferrin at Different Stages and Iron in Human Milk of Lactation” pp. 531–544, 1990.

[53] S. Teraguchi, H. Wakabayashi, H. Kuwata, and K. Yamauchi, “Protection against infections by oral lactoferrin : Evaluation in animal models,” pp. 231–234, 2004.

[54] M. Tomita, W. Bellamy, M. Takase, and K. Yamauchi, “Potent Antibacterial Peptides Generated by Pepsin Digestion of Bovine Lactoferrin,” pp. 4137–4142, 1991.

[55] T. Sakai, Y. Banno, Y. Kato, Y. Nozawa, and M. Kawaguchi, “Full Paper Pepsin-Digested Bovine Lactoferrin Induces Apoptotic Cell Death With JNK / SAPK Activation in Oral Cancer Cells,” vol. 48, pp. 41–48, 2005.

[56] J. Erman and E. Rankel, “Effects of Natural Phenolic Compounds on the Antioxidant Activity of Lactoferrin in Liposomes and Oil-in-Water Emulsions,” pp. 2392–2399, 2002.

[57] R. Reghunathan *et al.*, “BMC Immunology,” vol. 11, 2005.

[58] H. M. Farrell *et al.*, “Nomenclature of the Proteins of Cows ’ Milk — Sixth Revision,” pp. 1641–1674, 2004.

- [59] P. Restani, C. Ballabio, C. Di Lorenzo, S. Tripodi, and A. Fiocchi, "Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events," pp. 47–56, 2009.
- [60] T. Uniacke-low, T. Huppertz, and P. F. Fox, "Equine milk proteins : Chemistry , structure and nutritional significance," *Int. Dairy J.*, vol. 20, no. 9, pp. 609–629, 2010.
- [61] R. A. Inglingstad *et al.*, "Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine , bovine , caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes," vol.90, pp. 549-563, 2010.
- [62] F. Tidona, A. Criscione, T. Gulbrandsen, S. Bordonaro, D. Marletta, and G. Elisabeth, "Protein composition and micelle size of donkey milk with different protein patterns : Effects on digestibility," *Int. Dairy J.*, vol. 35, no. 1, pp. 57–62, 2014.
- [63] D. E. Otter and H. E. Indyk, "Analysis of bovine immunoglobulin G in milk , colostrum and dietary supplements : a review," pp. 93–109, 2007.
- [64] L. Herman, "Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits," *Food Control*, vol. 42, pp. 188-201, 2014.
- [65] N. P. Mo and N. Roos, "Bioactive peptides and proteins from foods : indication for health effects," pp. 171–182, 2008.
- [66] I. Recio, "Protective Effect of Milk Peptides : Antibacterial and Antitumor Properties," pp. 271–293, 2008.
- [67] I. Lo, "Synergistic Effect Between Different Milk-Derived Peptides and Proteins," pp. 2184–2189, 2008.
- [68] E. Salimei, M. Succi, and E. Sorrentino, "Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass ' milk Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass ' s milk," no. May 2014, 2002.
- [69] R. Di *et al.*, "Uses of mares ' milk in manufacture of fermented milks," vol. 14, pp. 767–775, 2004.
- [70] A. M. Studiorum and A. M. Studiorum, "Original article Use of donkey ' s milk for a fermented beverage with lactobacilli," vol. 85, pp. 481–490, 2005.
- [71] K. D. Kussendrager and A. C. M. Van Hooijdonk, "Lactoperoxidase : physico-chemical properties , occurrence , mechanism of action and applications," no. 2000, 2017.
- [72] O. Gornik, T. Pavi, and G. Lauc, "Biochimica et Biophysica Acta Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins — Implications on evolution and disease," vol. 1820, pp. 1318–1326, 2012.
- [73] S. Klapoetke, J. Zhang, S. Becht, X. Gu, and X. Ding, "The evaluation of a novel approach for the profiling and identification of N-linked glycan with a

procainamide tag by HPLC with fluorescent and mass spectrometric detection," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 53, no. 3, pp. 315–324, 2010.

[74] R. P. Kozak, C. B. Tortosa, D. L. Fernandes, and D. I. R. Spencer, "Comparison of procainamide and 2-aminobenzamide labeling for profiling and identification of glycans by liquid chromatography with fluorescence detection coupled to electrospray ionization – mass spectrometry," *Anal. Biochem.*, vol. 486, pp. 38–40, 2015.

[75] J. Alpert, "Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds," *Journal of Chromatography A.*, vol. 499, pp. 177–196, 1990.

[76] J. K. Palmer, "A Versatile System for Sugar Analysis via Liquid Chromatography," no. October 2012, pp. 37–41, 2006.

[77] X. Dong, S. Zhou, and Y. Mechref, "LC-MS/MS analysis of permethylated free oligosaccharides and N-glycans derived from human, bovine, and goat milk samples," *Electrophoresis*, vol. 37, no. 11, pp. 1532–1548, 2016.

[78] K. F. Medzihradzsky, K. Kaasik, and R. J. Chalkley, "Characterizing Sialic Acid Variants at the Glycopeptide Level," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 5, pp. 3064–3071, 2015.

[79] M. O. Altman and P. Gagneux, "Absence of Neu5Gc and Presence of Anti-Neu5Gc Antibodies in Humans-An Evolutionary Perspective," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, p. 789, 2019.

[80] M. Hedlund, V. Padler-Karavani, N. M. Varki, and A. Varki, "Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 48, pp. 18936–18941, 2008.

[81] A. N. Samraj *et al.*, "A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 2, pp. 542-547, 2015.

[82] T. Angata, A. Varki., "Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective," *Chem. Rev.* vol. 102, pp. 439-469, 2002.

[83] S. Kelm, R. Schauer, "Sialic acids in molecular and cellular interactions," *Int. Rev. Cytol.* vol.175, pp. 137-240., 1997.

[84] R. Schauer, "Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man," *Zoology (Jena)*, vol. 107, pp. 49-64, 2004.

[85] JT. Hutchins, CL. Reading, R. Giavazzi, J. Hoaglund, "Distribution of mono-, di-, and tri-O-acetylated sialic acids in normal and neoplastic colon," *Cancer Res.* vol. 48, pp. 483-489, 1988.

- [86] B. Mann, E. Klussmann, V. Vandamme-Feldhaus, M. Iwersen, "Low O-acetylation of sialyl-Le(x) contributes to its overexpression in colon carcinoma metastases." *Int. J. Cancer.*, vol. 72, pp. 258-264, 1997.
- [87] W. Wang *et al.*, "Comparison of anti-pathogenic activities of the human and bovine milk N-glycome: Fucosylation is a key factor," *Food Chem.*, vol. 235, pp. 167–174, 2017.
- [88] Nwosu, C. C., Aldredge, D. L., Lee, H., Lerno, L. A., Zivkovic, A. M., German, J. B., & Lebrilla, C. B., "Comparison of the human and bovine milk N-glycome via high-performance microfluidic chip liquid chromatography and tandem mass spectrometry." *Journal of proteome research*, vol. 11(5), pp.2912–2924, 2012.
- [89] X. Dong, S. Zhou, Y. Mechref *et al.*, "LC-MS/MS analysis of permethylated free oligosaccharides and N-glycans derived from human, bovine, and goat milk samples." *Electrophoresis.*, vol. 37,11. pp. 1532-48, 2016.