



Derleme Makalesi - Review Article

Kütle Spektrometresinden Glikan Mikrodizilerine: Glikomikte Analitik Tekniklere Genel Bir Bakış

From Mass Spectrometry to Glycan Microarrays: An Overview of Analytical Techniques in Glycomics

Burcu Tekin¹, Rafiq Gurbanov^{2*}

Geliş / Received: 06/07/2023

Revize / Revised: 23/08/2023

Kabul / Accepted: 08/09/2023

ÖZ

Glikanlar, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynayan ve sağlık ile hastalık üzerinde önemli etkileri olan karmaşık karbonhidrat molekülleri olarak bilinmektedir. Glikanların kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi, gelişmiş analitik tekniklerin bir kombinasyonunu gerektirmektedir. Bu derleme, glikan analizinde kullanılan çeşitli tekniklerin, örnekleme hazırlığı, glikan zenginleştirme, glikan salımı, etiketleme, ayırıştırma ve tespit gibi adımlarının ayrıntılı bir iş akışını sunmaktadır. Her adımın prensipleri, uygulamaları ve avantajları açıklanarak, glikan araştırmalarına katkıları vurgulanmaktadır. Ayrıca, spesifik glikan analiz hedefleri için uygun tekniklerin seçiminin önemi üzerinde durulmaktadır. Bu iş akışı, glikanların kapsamlı bir anlayışını sağlayarak, biyolojik sistemlerdeki rollerini açığa çıkarmaya ve yeni terapötik müdahalelerin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır.

Anahtar Kelimeler- *Glikomik, Analitik teknikler, Kütle spektrometrisi, Sıvı kromatografi, Glikan mikroarrayleri*

ABSTRACT

Glycans, complex carbohydrate molecules, play crucial roles in various biological processes, significantly affecting health and disease. The comprehensive analysis of glycans requires a combination of advanced analytical techniques. This review provides a detailed workflow of the various methods employed in glycan analysis, including sample preparation, glycan enrichment, glycan release, labeling, separation, and detection. Each step's principles, applications, and advantages are described, highlighting their contributions to glycan research. Additionally, the review emphasizes the importance of selecting appropriate techniques for specific glycan analysis goals. The workflow provides a comprehensive understanding of glycans, unraveling their roles in biological systems and facilitating the development of novel therapeutic interventions.

Keywords- *Glycomics, Analytical techniques, Mass spectrometry, Liquid chromatography, Glycan microarrays*

¹İletişim: burcutekinofficial@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0003-4177-2245>)

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoteknoloji Dr. Programı, Bilecik, Türkiye

^{2*}Sorumlu yazar iletişim: rafiq.gurbanov@bilecik.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-5293-6447>)

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye

Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama Ve Araştırma Merkezi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik, Türkiye

I. GİRİŞ

Glikomik, karbonhidratların veya glikanların biyolojik sistemlerdeki rollerinin incelenmesidir [1]. Glikanlar, hücre-hücre etkileşimleri [2], protein katlanması [3] ve sinyalleşme [4] de dahil olmak üzere birçok biyolojik süreç için önemli olan karmaşık biyomoleküllerdir. Glikanlar, basit şeker üniteleri veya monosakkaritlerden oluşurlar ve doğrusal veya dallı yapılar oluşturmak için birleştirilebilirler. Glikan yapıları son derece karmaşık olabilir. Hücre tipi, gelişim aşaması ve hastalık durumu gibi faktörlere bağlı olarak glikan yapıları değişebilir [1].

Biyolojik sistemlerde glikanların rollerini anlamak, geniş bir hastalık yelpazesinde etkili tedaviler ve teşhis araçları geliştirmek için kritiktir [5]. Glikanlar, tümör büyümesi, metastazı, iltihaplanma ve immün kaçınma gibi hastalık patogenezinin birçok yönünde rol oynarlar. Anormal glikosilasyon desenleri, meme [6], akciğer [7] ve kolon [8] kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde tespit edilmiştir, ve bu durum daha agresif hastalık ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Virüs ve bakterilerin yüzeyindeki glikanlar, bulaşıcılık ve konak spesifliğinde rol oynayabilir. Bu nedenle, bu yapıların anlaşılması aşılarda ve tedavilerin geliştirilmesine de yardımcı olabilir [9].

Glikan temelli tedaviler, kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisinde umut vaat etmektedir. Örneğin, kanser hücrelerindeki belirli glikanları tanıyan antikorlar, bu hücreleri normal hücrelere zarar vermeden seçici olarak hedefleyerek yok edilebilir. Ayrıca, glikan temelli aşılarda [10], influenza, HIV ve COVID-19 de dahil olmak üzere farklı enfeksiyöz hastalıkların önlenmesi için geliştirilmiştir [11].

Glikomik, bir organizmanın biyolojik sistemlerini anlamak için genomik ve proteomik'e benzer bir amaç taşır. Ancak, glikomik çalışmaları, glikosilasyon yoluyla proteinlere ve lipidlere bağlanan glikan yapılarına odaklanması açısından benzersizdir. Doğru bir genomik ve proteomik, sırasıyla DNA ve proteinlerin çalışmasına odaklanırken, glikomik çalışmaları glikan yapılarının incelenmesine odaklanır. Bilindiği üzere glikosilasyon en yaygın ve kompleks post-translasyonel protein modifikasyonlarından [12]. Proteinlere ek olarak birçok yağ molekülünde glikosile olabilir [13]. Dahası, yakın zamanda gösterildiği üzere glikan yapıları RNA molekülünde bağlanabilmektedir [14]. Önemli olarak, protein glikosilasyonunda, farklı glikanların proteinde aynı bağlanma bölgesine bağlanmaları büyük oranda bu proteinlerin yapısal çeşitliliğine etki etmektedir. Aynı zamanda bu durum molekül fonksiyonunda da değişimlere neden olmaktadır.

Protein glikosilasyonunun en çok çalışıldığı alanlardan bir tanesi patojenlere karşı mücadelede etkili olan immunoglobulinlerdir [15]. Yabancı bir antijene bağlanmak, immunoglobulinlerin işlevinin yalnızca bir yönüdür. Immunoglobulin G (IgG) glikozilasyonunda değişiklik, immunoglobulinlerin farklı reseptörlere yönlendirilerek farklı immün sistem dallarını aktive etme konusunda bir kontrol noktası oluşturur. Antikorların sabit bölge alanı (CH2) içinde yer alan fragman kristalizasyonel (Fc) bölgesine bağlı glikanlar, Fc reseptörleri ve diğer proteinlerle etkileşime giren ayrılmaz yapısal bir bileşen olarak rol oynarlar [9]. Polipeptit omurgasına farklı bir glikan bağlanması, antikorun yapısını modüle ederek farklı reseptörlere olan afinitesini değiştirir. En iyi bilinen örnek, IgG'nin Fc- γ -reseptör IIIA'ya bağlanmasıyla zayıflatarak antikor bağımlı hücrel sitotoksositeye (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity /ADCC) karşı bir "güvenlik anahtarı" olarak işlev gören çekirdek-fukozun rolüdür. Antikor-bağımlı fagositoz ve sıklıkla çeşitli glikozilasyon özelliklerinin etkileyici bir şekilde bağımlı olduğu kompleman aktivasyonu gibi diğer etkileyici işlevler de IgG Fc glikozilasyonu tarafından modüle edilir. Bu ve benzer nedenlerle, glikozilasyon, farklı terapötik monoklonal antikorların (mAb'ler) geliştirilmesinde temel bir unsurdur [16].

Proteinin yapısını etkileyen genetik değişikliklerden farklı olarak, glikanlar epigenetik ve çevresel etkilere bağlı karmaşık bir gen ağı tarafından regüle edilir [17]. Bu durum protein fonksiyonunun dinamik olarak düzenlenmesine imkan verir. Glikozilasyondaki değişiklikler çeşitli hastalıklar ve fizyolojik durumlarda gözlemlenmiştir ve genellikle belirgin semptomlardan önce ortaya çıkar. Bu değişiklikler hastalıkların gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunabilir [18]. Örneğin, yaşlanma ile birlikte IgG antikorlarının glikozilasyon profilinde anti-enflamatuar bir durumdan pro-enflamatuar bir duruma geçiş görülür ve bu durum kardiyometabolik ve enflamatuar hastalıkların artan riski ile ilişkilidir. Glikozilasyon desenlerinin anlaşılması hastalık mekanizmalarına dair önemli bilgiler sunabilir ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlar.

Bu çalışmanın amacı, protein glikozilasyon analiz tekniklerini açıklamak ve bunların temel iş akışlarını özetlemektir. Bu teknikler, protein glikozilasyonunun karmaşıklığına ve heterojenliğine uygun olarak, farklı glikan yapıları ve bileşenlerinin tanımlanmasına olanak tanır. Ancak, glikan analizi, özel bilgi ve uzmanlık gerektiren karmaşık ve zorlu bir alandır. Dolayısıyla bu derleme, glikan analizi için kullanılan ana teknikleri, kütle spektrometrisi, sıvı kromatografisi ve glikan mikroarray teknolojisi de dahil olmak üzere özetlemeyi, bu tekniklerin avantajlarını, sınırlamalarını ve farklı bağlamlarda kullanımlarını tartışmayı amaçlamaktadır. Sonuç olarak, çalışmamız, glikan analizi tekniklerine kapsamlı bir genel bakış sağlayarak, araştırmacıların bu önemli alana erişimini kolaylaştırmayı hedeflemektedir.

II. PROTEİN GLİKOZİLASYONUNUN YAPISAL ANALİZİ VE KARAKTERİZASYONU

Glikoproteinler, spesifik amino asit kalıntılarına kovalent olarak bağlı karbonhidrat (glikan) kısımlarına sahip proteinlerdir [19]. Glikan zincirleri tipik olarak dallıdır ve glikoz, mannoz, galaktoz ve sialik asit gibi çeşitli monosakkarit birimlerinden oluşur. Glikoproteinlerin yapısı iki ana bileşene ayrılabilir: protein omurgası ve bağlı glikanlar. Bir glikoprotein protein omurgası, doğrusal bir amino asit dizisinden oluşur. Glikanların eklendiği amino asit kalıntıları tipik olarak asparajin (N-bağlı glikosilasyon) veya serin/treonindir (O-bağlı glikosilasyon). N-bağlı glikosilasyon, glikan, X'in prolin dışında herhangi bir amino asit olabileceği konsensüs dizisi Asn-X-Ser/Thr içindeki bir asparajin kalıntısının yan zincir nitrojen atomuna bağlandığında meydana gelir [20]. Glikoproteinlere bağlı glikanların uzunluğu, dallanma modeli ve bileşimi değişebilir. Karbonhidrat zincirleri, glikan kesme ve terminal şeker kalıntılarının eklenmesi gibi işlemlerle daha da modifiye edilebilir [18]. Bu modifikasyonlar, glikoproteinler arasında önemli yapısal çeşitliliğe yol açar. Üç boyutlu yapı açısından, glikoproteinler, glikosile edilmemiş proteinlere benzer şekilde alfa sarmalları, beta yaprakları ve rastgele sarmallar dahil olmak üzere çeşitli konformasyonlarda bulunabilir. Bağlı glikanlar, protein yüzeyinden uzağa uzanarak protein-protein etkileşimlerini, antijeniteyi ve çözünürlüğü etkileyebilen bir glikan kalkanı oluşturabilmektedirler [21].

Glikan karakterizasyonu, bir glikan molekülünün spesifik yapısını ve özelliklerini belirleme sürecini ifade eder [22]. Bu bilgi, glikanların biyolojik işlevini anlamamın yanı sıra glikan işlev bozukluğuyla ilgili hastalıklar için teşhis araçları ve tedaviler geliştirmek için gereklidir. Glikan karakterizasyon yöntemleri arasında kütle spektrometrisi (Mass spectrometry / MS), nükleer manyetik rezonans (Nuclear magnetic resonance / NMR) spektroskopisi, kapiler elektroforez ve kromatografi yer alır. Bu yaklaşımlara ek olarak, glikan karakterizasyonu için glikan mikrodizileri, enzimatik yöntemler ve glikan etiketlemesi kullanılır. Araştırmacılar, çeşitli yaklaşımları birleştirerek, bir glikan molekülünün benzersiz yapısı ve özelliklerinin yanı sıra biyolojik sistemlerdeki diğer biyomoleküllerle nasıl etkileşime girdiği hakkında kapsamlı bir bilgi edinebilirler. Bu bilgi, glikanlarla ilgili hastalıklar için yeni tanı araçları ve tedaviler geliştirmede kullanılabilir.

A. Glikan Analiz Aşamaları

Glikan analizi ve karakterizasyonu, glikanların yapısını ve biyolojik işlevlerini anlamak için kritik öneme sahip olan bir dizi teknik ve metodolojiyi kapsayan bir disiplindir. Glikanlar, hücre-yüzey reseptörleri, hücre adezyonu, enfeksiyon ve inflamasyon gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynarlar [23]. Bu nedenle, glikanların analizi ve karakterizasyonu, hastalıkların tanısı, progresyonu ve tedavisi için kritik öneme sahiptir. Bu bölümde, glikan analizinde uygulanan tipik bir iş akışı anlatılacaktır. Bu iş akışı, numune hazırlığı, analitik yöntem seçimi, glikan ayrımı, glikan analizi, veri yorumlama/doğrulama ve karakterizasyon aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Glikan analiz aşamalarının şematik bir gösterimi

B. Glikan Örneklerinin Analiz Hazırlığı

Numune hazırlama, ekstrakte edilen glikanların kalitesini ve güvenilirliğini önemli ölçüde etkileyen, glikan analizinde kritik ve karmaşık bir adımdır. Numune hazırlama tekniklerinin seçimi, biyolojik matrisin

doğasına ve gerçekleştirilen spesifik glikan analizine bağlıdır. Glikoprotein analizi için ilk adım, proteinlerin biyolojik numuneden çıkarılmasını içerir. Bu, çöktürme, diyaliz veya santrifüjleme gibi çeşitli yöntemlerle elde edilebilir. Bu teknikler, karışan maddelerin çıkarılmasına ve ilgilenilen glikoproteinlerin izole edilmesine yardımcı olur.

Proteinler ekstrakte edildikten sonra, glikanları protein omurgasından serbest bırakmak için yaygın olarak enzimatik sindirim kullanılır [24]. PNGase F veya Endo H gibi enzimler, sırasıyla glikan ve protein arasındaki N-glikan veya O-glikan bağlantısını ayırmak için kullanılır [25]. Bu adım, daha fazla analiz için glikanların serbest bırakılmasına izin verir. Bazı durumlarda, salınan glikanları numunede bulunan diğer bileşenlerden izole etmek için ek ayırma teknikleri gereklidir. Örneğin katı faz ekstraksiyonu (Solid phase extraction / SPE), glikanları proteinlerden ve diğer kontaminantlardan ayırarak karışımdan seçici olarak bağlamak ve ayırtmak için kullanılabilir [26]. İyon değiştirme kromatografisi [27] veya boyut dışlama kromatografisi [28] gibi kromatografi teknikleri de glikanları boyutlarına, yüklerine veya diğer fiziksel özelliklerine göre ayırmak ve saflaştırmak için kullanılabilir.

Alternatif olarak, glikanlar doğrudan dokular, kan veya idrar gibi biyolojik numunelerden ekstrakte edilebilir. Asit hidrolizi veya alkali bozunma yöntemleri, glikan yapılarını parçalamak ve bunları numune matrisinden serbest bırakmak için yaygın olarak kullanılır [29]. Bununla birlikte, doğrudan ekstraksiyon yöntemlerinin genellikle daha fazla saflaştırma ve ayırma adımları gerektiren karmaşık glikan karışımları verdiği dikkat edilmelidir. Belirli durumlarda, ekstrakte edilmiş glikanların türevlendirilmesi, sonraki analitik yöntemlerde bunların saptanmasını veya ayrılmasını geliştirmek için gerçekleştirilebilir. Bu, kimyasal etiketler veya floresan etiketler ekleyerek glikanların kimyasal veya fiziksel özelliklerini değiştirmeyi içerir [30]. Türevlendirme, belirli analitik tekniklerle glikanların duyarlılığını, seçiciliğini ve uyumluluğunu geliştirebilir.

Genel olarak, glikan analizinde doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için uygun numune hazırlama tekniklerinin titizlikle seçilmesi çok önemlidir. Seçilen yöntemler, kontaminasyonu veya bozulmayı en aza indirirken glikanları biyolojik matristen etkili bir şekilde çıkarmalı ve serbest bırakmalıdır. Uygun numune hazırlama, glikanların kalitesini ve bütünlüğünü garanti ederek güvenilir aşağı akış analizleri yapılmasını ve yapı/işlevlerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlar.

C. Glikan Ayrımı

Glikan ayırma teknikleri, glikanların karmaşık bir biyolojik matristen izolasyonuna ve saflaştırılmasına izin veren glikan analizinde kritik bir adımdır. Glikanlar, biyolojik numunelerde farklı glikoformların bir karışımı olarak bulunabilir [31]. Doğru bir analiz için bu glikanların uygun bir şekilde ayrılması gereklidir. Glikanların, karmaşık bir matristen ayrımı, kromatografi, elektroforez ve MS gibi çeşitli teknikler ile sağlanabilmektedir.

Kromatografi uygulamaları, glikanları sahip oldukları, boyut, yük ve hidrofobiklik gibi fizikokimyasal özelliklerine ayırabildiğinden, glikan ayrımı için yaygın olarak kullanılmaktadır [32]. Literatürde, glikanların ayrımı için kullanılmış farklı kromatografi çeşitleri bulunmaktadır. Bunlardan iyon değiştirme kromatografisi (Ion-exchange chromatography / IEC) glikanları sahip oldukları yüklerine göre ayırmaktadır [27, 33]. Glikanların yükleri, karboksil, sülfat ve fosfat grupları gibi çeşitli fonksiyonel grupların varlığından etkilenir. IEC tekniğinde, yüklü fonksiyonel gruplar içeren bir kolon kullanılmaktadır [34]. Glikan karışımı bu kolondan geçirildiğinde, karışımın içerisindeki glikanlar sahip oldukları yüklerle bağlı olarak kolonun üzerindeki yüklü fonksiyonel gruplar ile etkileşime girerler. Bu etkileşimin derecesi, glikanların net yüküne, yapılarına ve mobil fazın sahip olduğu pH ve tuz konsantrasyonuna göre değişebilmektedir. Net pozitif yüke sahip glikanlar, negatif yüklü fonksiyonel gruplarla, net negatif yüklü glikanlar ise pozitif yüklü fonksiyonel gruplar ile etkileşime girer [35]. Nötür net yüke sahip glikanlar ise herhangi bir etkileşime girmeden kolondan geçerler. IEC tekniğinde, mobil fazın pH ve tuz konsantrasyonları ayarlanarak, glikanların yüklü fonksiyonel gruplar ile etkileşimi ayarlanabilir ve istenilen glikan gruplarının ayrımı sağlanabilir [36].

Bir diğer kromatografi tekniği glikanları boyutlarına göre ayırabilen boyut dışlama kromatografisidir (Size exclusion chromatography / SEC) [28]. Bu teknikte, belirli boyut aralığına sahip gözenekli jel matris içeren bir kolon kullanılır. Karışık glikan örneği bu kolondan geçirilir. Örnek kolon boyunca ilerledikçe, farklı boyutlardaki glikanlar jel matrisin gözeneklerine giriş yapar ve çıkış yaparken farklı hızlarda ilerler. Daha büyük glikanlar, daha küçük gözeneklere giremez ve bu nedenle kolondan daha önce çıkar, daha küçük glikanlar ise daha küçük gözeneklere girebilir ve kolondan çıkış yapmaları daha uzun süre alır. Her glikanın elüsyon hacmi kaydedilir ve moleküler ağırlıkları karşısında grafiklenir, bu da örnek içindeki glikanların moleküler ağırlık dağılımının belirlenmesini sağlar. SEC'nin bir sınırlaması, moleküler ağırlığın elüsyon hacminden çıkarılmasıdır, bu nedenle kolonu kalibre etmek için uygun moleküler ağırlık standartlarının kullanılması önemlidir [28]. Ayrıca, glikanların şekli, elüsyon profilini etkileyebilir, bu nedenle SEC sonuçlarını yorumlarken hem glikanların boyutunu hem de şeklini dikkate almak önemlidir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography / HPLC), farklı bileşenlerin bir karışımdan ayrılması için kullanılan bir tekniktir [37, 38]. HPLC, sıvı fazda bulunan bileşenlerin mobil fazda taşınması ve ayrılması prensibine dayanır [39]. HPLC'nin en yaygın kullanılan türü, aşamalı olarak değişen polariteye sahip bir sabit faz üzerindeki mobil fazın hareketiyle ayırım sağlayan ters fazlı kromatografidir (Reverse-phase chromatography / RPC) [40]. RPC'de, hidrofobik bir malzeme olan C18-bağlanmış silika gibi bir sabit faz kullanılır ve glikanlar gibi hidrofilik biyomolekülleri hidrofobisitelere göre ayırmak için mobil fazda organik bir çözücü kullanılır [41]. Glikanlar, kolon üzerine yüklenir ve artan organik çözücü konsantrasyonundaki mobil faz gradyanı ile elüe edilirler. Çözücü daha hidrofobik hale geldikçe, daha yüksek hidrofobisitesi olan glikanlar sabit faza daha güçlü bir şekilde bağlanacak ve daha uzun süre kolonda kalacaklardır. Glikanlar daha sonra daha güçlü bir çözücü veya daha yüksek oranda organik çözücü kullanılarak kolondan elüe edilebilirler. RPC, benzer yapıları olan ancak farklı hidrofobisiteyi olan glikanların ayırımı için kullanışlı bir tekniktir. Mobil faz koşullarını değiştirerek, ayırımı optimize etmek ve glikanların yüksek çözünürlüklü ayırımı elde etmek mümkündür. Ayırt edilen glikanlar daha sonra kütle spektrometresi gibi çeşitli tekniklerle analiz edilerek yapıları ve fonksiyonel grupları tanımlanabilir [42, 43]. Bunun yanında, hidrofilik etkileşim kromatografisi (Hydrophilic interaction liquid chromatography / HILIC), glikanların ayrılması için kullanılan bir diğer kromatografi tekniğidir [44]. Bu teknik, glikanların hidrofilik özelliklerine dayanır. HILIC'de, bir sıvı kromatografi kolonu kullanılır ve kolonda yer alan bir adsorban, yüksek hidrofilikliği olan polar gruplara sahip bir malzemedir [45]. Glikan karışımı, polar bir mobil faz içinde kolona enjekte edilir. Mobil faz, suya benzer bir polar çözücü içerir ve genellikle organik çözücü ile karıştırılır. Bu sayede hidrofilik etkileşim kolaylaştırılır. Polar glikanlar, yüksek hidrofilikliğe sahip olan adsorban üzerindeki hidrofilik gruplarla güçlü bir şekilde etkileşime girer ve kolon içinde yavaş hareket ederken daha az polar olanlar daha hızlı hareket eder [46]. HILIC kromatografisi, diğer kromatografi yöntemlerinden farklı olarak, sadece şeker moleküllerini değil, aynı zamanda glikoproteinlerin veya glikolipitlerin hidrofilik oligosakkaritlerini de ayırabilir [47]. Bu nedenle, HILIC, diğer kromatografi teknikleri ile birlikte kullanıldığında, karmaşık glikan karışımlarını ayırtmak için etkili bir yöntem olabilir [44, 48].

Son olarak, spesifik glikanların ayırılması için özelleşmiş kromatografik tekniklerde bulunmaktadır. Bunlardan biri olan afinite kromatografisi, spesifik moleküllerin, bir katı destek üzerine immobilize edilmiş ligandlarla etkileşimlerine dayanarak ayrılması ve saflaştırılması için kullanılan bir tekniktir. Glikanların ayrılması için kullanılan afinite kromatografisinde, ligand olarak spesifik şeker bileşenlerine yüksek özgüllükte bağlanabilen lektinler sıkça kullanılmaktadır [49]. Afinite kromatografisinde, immobilize edilmiş lektin içeren bir kolon kullanılır ve glikan karışımı sütun üzerinden geçirilir [50]. Lektinin bağlanma bölgesi ile eşleşen spesifik bir şeker bileşenine sahip olan glikanlar immobilize edilmiş lektine bağlanırken, diğer glikanlar bağlanmadan kolonun içinden geçer [51]. Bağlanan glikanlar daha sonra deney koşulları değiştirilerek (örneğin, pH veya tuz konsantrasyonunu) veya rekabetçi bir ligand kullanarak kolondan elüe edilebilir. Afinite kromatografisi, özellikle ilgilenilen glikanların belirli bir lektin tarafından tanınabilen benzersiz bir şeker yapısına sahip olduğu durumlarda, spesifik glikanların saflaştırılması için güçlü bir teknik olabilir [52]. Her kromatografi yönteminin kendi avantajları ve dezavantajları vardır ve yöntemin seçimi, spesifik glikanın özelliklerine bağlıdır.

Elektroforez, biyomoleküllerin ayrılması için kullanılan diğer bir tekniktir. Bu teknik, moleküllerin yük ve büyüklük farklılıklarına göre ayrılmasını sağlar [53]. Glikanların ayrılması için kullanılan elektroforez teknikleri arasında poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis / PAGE) [54], ve kapiller elektroforez (Capillary electrophoresis / CE) [55] yer alır. PAGE, glikanları yük ve büyüklük farklılıklarına göre ayırmak için kullanılmaktadır. Glikan numuneleri poliakrilamid jel üzerine yerleştirilir ve ardından elektrik alanı uygulanır. Daha küçük ve negatif yüklü glikanlar, jeli daha hızlı geçer. Dolayısıyla farklı glikan yapıları, jeldeki göç paternleri ile belirlenebilir. CE ise glikanları dar bir kapillar tüp içinde elektrolitik tampon kullanarak ayırır. Glikan örnekleri yüksek çözünürlüklü ayırım elde etmek için sisteme enjekte edilir. Elektrik alanı altında, glikanlar tüp içinde yükleri ve büyüklükleri nedeniyle farklı hızlarda hareket ederler. Bu yöntem, özellikle glikoproteinlerde bulunan glikanların analizinde yaygın olarak kullanılır ve yüksek çözünürlüklü ayırım sağlama kapasitesi ile öne çıkar [56]. Elektroforez teknikleri, glikanların ayrılması için güçlü araçlardır ve farklı glikan yapılarını ayırt etmek için kullanılır. Her teknik, belirli uygulamaya ve istenen çözünürlüğe bağlı olarak seçilebilir, ayrıca elektroforez farklı teknikler ile birlikte de kullanılabilir [57].

Özet olarak, glikan ayırımı, glikanların karmaşık biyolojik matrislerden izolasyonuna ve saflaştırılmasına izin veren glikan analizinde çok önemli bir adımdır. Ayırma yönteminin seçimi, spesifik glikan özelliklerine ve daha fazla analiz için kullanılan analitik saptama yöntemlerine bağlıdır. Doğru ve kapsamlı glikan analizi, glikanların biyolojik işlevinin daha iyi anlaşılmasını, tanısal ve terapötik uygulamaların geliştirilmesini sağlayan uygun glikan ayırımına dayanır.

Tablo 1. Glikan analizinde kullanılan kromatografi yöntemleri ve teknik özellikleri.

Kromatografi Yöntemi	Tipik Kolon Dolgu Maddeleri	Temel Ayırma Prensipleri	Kullanım Alanları	Avantajlar
Ters Fazlı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) [37-43]	C18 (oktadekil silika); C8 (oktil silika); C4 (butil silika) gibi alkil zincirli, hidrofobik dolgular	Glikanların hidrofobik bölgelerine göre ayrılması	- Hidrofobik glikan bölgelerin analizi için etkilidir. - Protein-glikan etkileşimlerinin araştırılmasında kullanılır.	- Geniş uygulama yelpazesi. - Kararlı ve tekrarlanabilir sonuçlar.
Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (HILIC) [45-48]	Amin/Amid veya diol grupları içeren silika tabanlı dolgu maddeleri (ZIC®-HILIC kolonu, BEH-Amid HILIC kolonu, HALO® kolonu)	Glikanların hidrofilik bölgelerine göre ayrılması.	- Hidrofilik glikan bölgeleri analizi için idealdir. - Glikan türlerinin belirlenmesi ve profillemeye için yaygın olarak kullanılır.	- Genellikle hızlı analiz süreleri. - Düşük çözücü tüketimi.
İyon Değişirme Kromatografisi (IEC) [27-36]	İyon değiştirici gruplar içeren dolgu maddeleri	Glikanların yüklü bölgelerine göre ayrılması.	- Glikanların yüklü bölgeleri ve iyonik bileşenlerin analizi için uygundur. - Glikan türlerinin karakterizasyonu ve kuantifikasyonu için kullanılır.	- İyonik özelliklerin hassas ayarlanabilir olması. - Geniş pH aralığında kullanılabilirlik.
Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC) [28]	Poröz jel türleri (sefalozon, agaroz)	Glikanların boyutlarına göre ayrılması.	- Büyüklük bazlı glikan analizi ve karşılaştırmalı profillemelerde kullanılır. - Glikan varyantlarının belirlenmesi ve moleküler ağırlık tahmini için kullanışlıdır.	- Basit örnek hazırlığı. - Non-denatürant koşullarda çalışma.
Afinite Kromatografisi [49-52]	Spesifik bağlama ligandları ile kaplı dolgu maddeleri (lektinler, antikolar)	Glikanların özgül bağlama etkileşimlerine göre ayrılması.	- Glikan-protein etkileşim analizi ve tanımlanması için kullanılır. - Yapısal ve fonksiyonel glikan analizleri için özgül bir yöntemdir.	- Yüksek özgüllük ve seçicilik.

D. Glikan Analizi: Analitik Teknikler

Glikan analizi, glikanların birçok biyolojik süreçteki kritik rolü nedeniyle önemli, ilgi uyandıran, hızlı ilerleyen bir alandır. Glikan analizi için analitik yöntemler, bu karmaşık karbonhidrat moleküllerinin saptanmasını, ölçülmesini ve karakterizasyonunu sağlayan çeşitli teknikleri içerecek şekilde gelişmiştir. MS, NMR ve glikan dizileri, glikan analizinde sıklıkla kullanılan üç ana analitik yöntemdir.

MS, karmaşık glikanların analizi için güçlü bir analitik tekniktir [58]. MS, glikanların kütlesi, bileşimi ve yapısı hakkında bilgi sağlayarak karmaşık biyolojik numunelerde bunların tanımlanmasını ve miktarının belirlenmesini sağlayabilir [59]. Glikan analizinde MS, karmaşık karışımlardaki glikanların saptanmasını ve miktarının belirlenmesini sağlamak için kütle etiketleme veya flüoresan etiketleme gibi glikan işaretleme teknikleriyle birlikte yaygın olarak kullanılır [60, 61]. MS ayrıca bozulmamış glikanların veya glikopeptidlerin analizi için kullanılabilir. Teknik, glikan kalıntısı ve glikosilasyon bölgesi hakkında ayrıntılı yapısal bilgi sağlar [62]. Glikanların MS analizi tipik olarak numune hazırlama, ayırma, iyonizasyon ve kütle analizi dahil olmak üzere birkaç adımı içerir. Numune hazırlama, glikanların glikoproteinlerden enzimatik salınmasını veya kromatografi teknikleri kullanılarak glikanların zenginleştirilmesini içerebilir. Ayırma, sıvı kromatografisi (Liquid chromatography / LC) [63] veya CE kullanılarak elde edilebilir; LC, glikan analizinde en yaygın kullanılan tekniktir. Ayırma işleminden sonra glikanlar, tipik olarak matris destekli lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (Matrix-assisted laser deposition/ionization / MALDI) [64] veya elektrosprey iyonlaştırma (Electrospray ionization / ESI) [65] kullanılarak iyonlaştırılır. MALDI bozulmamış glikanların analizini sağlarken, ESI daha yaygın olarak glikopeptidlerin veya glikoproteinlerin analizi için kullanılır. İyonize glikanlar daha sonra uçuş süresi (Time-of-flight / TOF) [66] veya iyon tuzağı kütle analizörleri kullanılarak gerçekleştirilebilen kütle analizine tabi tutulur. Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (Fourier-transform ion cyclotron resonance / FT-ICR) veya Orbitrap gibi yüksek çözünürlüklü kütle analizörleri daha fazla hassasiyet ve çözünürlük sağlayabilir [67]. MS'in glikan tespit limitleri, kullanılan özel teknik, enstrümanın duyarlılığı, örnek hazırlığı ve analiz edilen glikan türüne göre değişkenlik gösterir. MS teknikleri, genel olarak glikan analizi için düşük tespit limitleri sunma eğilimindedir. MALDI-TOF-MS, ESI-MS ve LC-MS gibi çeşitli MS yöntemleri, genellikle femto- ila pikomol (10^{-15} ila 10^{-12} mol) aralığındaki glikan tespit limitlerine sahiptir. Ancak bu hassas sınırlar, iyonizasyon verimliliği, enstrüman çözünürlüğü ve örnek matrisinin karmaşıklığı gibi faktörlere bağlı olarak farklılık gösterebilir [68]. Elde edilen MS verileri, glikanların tanımlanmasını, ölçülmesini ve karakterizasyonunu sağlayan GlycoWorkbench [69] veya SimGlycan [70] gibi özel yazılım araçları kullanılarak analiz edilebilir. Glikanların karmaşık doğası yanlış pozitif veya yanlış negatif verilerin oluşmasına yol açabileceğinden, MS tabanlı glikan analizinde veri doğrulama ve kalite

kontrolü kritik öneme sahiptir[71]. Bu nedenle, verilerin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak için sıkı bir şekilde doğrulama ve kalite kontrol prosedürleri kullanılmalıdır [72].

Glikan analizi için kullanılan tekniklerden bir diğeri NMR spektroskopisidir [73, 74]. NMR spektroskopisi, çözelti içindeki moleküllerin yapısal ve dinamik özellikleri hakkında bilgi sağlayabilen güçlü bir analitik tekniktir. NMR spektroskopisinin glikan tespit limitleri, kullanılan özel NMR tekniği, enstrüman duyarlılığı, örnek hazırlığı ve analiz edilen glikan türüne bağlı olarak değişebilir. Genel olarak, NMR, glikan analizi için nispeten orta düzeyde veya düşük tespit limitleri sunar. NMR teknikleri ile glikan türlerini tespit etmede genellikle en az nanomol (10^{-9} mol) seviyesinde glikan örneği gereklidir. Ancak bazı araştırmalarda gerekli optimizasyon işlemleri sonrasında 15 pikomol seviyelerinde bir glikan miktarının NMR analizi için yeterli olabileceği gösterilmiştir [75]. Tespit limitleri, sinyal-gürültü oranı, örnek saflığı ve örnekteki diğer bileşiklerin varlığı gibi faktörlerden etkilenir. NMR, bazı MS teknikleri kadar hassas olmasa da, glikan moleküllerinin bağlantıları ve konformasyonları konusunda değerli yapısal bilgiler sunar [76]. Glikan analizi bağlamında, NMR spektroskopisi glikanların bileşimini, bağlantısını ve konformasyonunu belirleme konusunda bilgi sağlayabilir. Bir glikanın NMR spektrumu, moleküldeki farklı atomlara karşılık gelen bir dizi rezonans içerir. Bu rezonansların kimyasal kaymaları, hangi atom türlerinin ve kimyasal çevrelerinin mevcut olduğunu belirlemek için kullanılabilir. Örneğin, bir glikan kalıntısının anomerik karbonu genellikle karakteristik bir kimyasal kayma noktasında rezonansa girer ve bu, şeker kalıntısının kimliğini belirlemek için kullanılabilir [77]. Kimyasal kaymaların yanı sıra, glikanda çekirdekler arasındaki bağlar, şeker kalıntıları arasındaki bağlantıyı belirlemede bilgi sağlayabilir. Örnek olarak, anomerik karbon ve glikozidik bağın yanındaki proton arasındaki etkileşim, bağlantının α veya β konfigürasyonunu belirlemek için kullanılabilir [78]. NMR spektroskopisi ayrıca, glikanların çözeltideki konformasyonu hakkında bilgi sağlayabilir [79]. Glikanın konformasyonu, diğer biyomoleküllerle etkileşimlerini etkileyebilir ve biyolojik işlevinde rol oynayabilir. NMR spektroskopisi, bağ açılarını yansıtan bağlanma sabitlerinin ölçümü yoluyla glikanların konformasyonunu belirleyebilir [80, 81]. Bu bilgi, glikanların bağışıklık yanıtları, hücre yüzey tanımlaması ve diğer biyolojik işlevleri üzerindeki etkilerini anlamamıza yardımcı olabilir. Ancak, NMR spektroskopisi glikan analizi için tek başına yeterli değildir [75]. Glikanların yapısının tam olarak belirlenmesi için genellikle diğer tamamlayıcı tekniklerle birlikte kullanılmalıdır.

Glikan mikrodizileri, çoklu glikan-protein etkileşimlerinin yüksek verimli taranmasına izin veren glikan analizi için güçlü bir araçtır [82]. Glikan mikrodizileri, esas olarak, yüksek yoğunluklu bir dizi biçiminde hareketsizleştirilmiş glikanların bir koleksiyonudur ve araştırmacıların, birden fazla glikanın bağlanma özelliklerini biyolojik olarak ilgili, fakat, farklı numunelerle aynı anda test etmelerine olanak tanır. Bir glikan mikrodizisi oluşturma işlemi, çok sayıda farklı glikanın bir cam slayt veya bir mikrotitre plakası gibi katı bir destek üzerine sabitlenmesini içerir. Glikanlar, glikan-protein etkileşimlerinin verimli ve sistematik olarak taranmasına izin verecek şekilde uzamsal olarak adreslenebilir bir şekilde düzenlenir [83]. Glikanlar mikrodizi üzerinde hareketsiz hale getirildikten sonra, glikanlarla etkileşimleri için farklı biyolojik numuneler test edilebilir. Örneğin, floresan etiketli proteinler veya antikolar, hareketsizleştirilmiş glikanların bağlanma özelliklerini ve etkileşim güçlerini araştırmak için kullanılabilir [84]. Hareketsizleştirilmiş glikanlar ve numuneler arasındaki etkileşimler, floresan tespiti [85] veya yüzey plazmon rezonansı gibi çeşitli teknikler kullanılarak tespit edilebilir ve ölçülebilir [86, 87]. Glikan mikrodizileri, glikan analizi için çeşitli avantajlar sunar [88]. İlk olarak, çoklu glikan-protein etkileşimlerinin aynı anda yüksek verimli taranmasına izin verirler. Bu yüksek verimli yaklaşım, glikan bağlanması için çeşitli özelliklere sahip lektinleri veya antikoları incelemek için özellikle değerlidir. İkincisi, glikan mikrodizileri, karmaşık ve dinamik glikan-protein etkileşimlerinin sistematik ve tekrarlanabilir şekilde incelenmesini sağlar. Araştırmacılar, sabitlenmiş glikanları sistematik olarak değiştirerek, glikan tanıma için önemli olan belirli yapısal özellikleri veya motifleri belirleyebilir ve glikan-protein etkileşimlerinin moleküler temeli hakkında fikir edinebilir. Ek olarak, glikan mikrodizileri, glikan etkileşimlerini incelemede düşük tespit limitleri sağlayan önemli bir araç olarak öne çıkar. Bu teknoloji, genellikle glikanların hedef moleküllerle etkileşimlerini nanomolar (10^{-9} mol) ila pikomolar (10^{-12} mol) konsantrasyon aralığında tespit edebilir. Tespit limitleri, kullanılan yönteminin hassasiyeti, immobilize edilen glikanların kalitesi ve glikan ile hedef molekül arasındaki etkileşimler gibi bir dizi faktöre bağlı olarak şekillenir [89].

Sonuç olarak, glikan analizi, çeşitli analitik tekniklere dayanan karmaşık bir alandır. MS, NMR spektroskopisi ve glikan dizileri, glikan analizinde kullanılan ve her biri glikanların yapısı, işlevi ve etkileşimleri hakkında benzersiz bilgiler sağlayan ana yöntemlerdendir. Yeni analitik yöntemlerin sürekli gelişimi, bu karmaşık karbonhidrat moleküllerinin tespiti ve bunların biyoloji ve hastalığındaki rolleri hakkındaki anlayışımızı ilerletmek için önemlidir.

E. Glikan Etiketleme

Glikan işaretleme teknikleri, kompleks karbonhidrat moleküllerinin tanımlanması, miktarlarının belirlenmesi ve karakterizasyonu için kullanılan araçlardır [30]. Bu teknikler, glikanların biyolojik fonksiyonları ve hastalıkta oynadıkları roller hakkında bilgiler sağlayarak, glikan analizinde önemli bir yer tutarlar. Florasan

işaretleme, kütle etiketi işaretleme, hidrazid işaretleme, klik kimyasal işaretleme ve enzimatik işaretleme gibi birkaç yaygın kullanılan glikan işaretleme tekniği vardır.

Floresan etiketleme, glikanların gerçek zamanlı tespitini sağlama kabiliyeti nedeniyle glikan analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır [90]. Teknik, floresan boyaların glikanlara bağlanmasını içerir ve böylece glikanların görselleştirilmesine ve miktarının belirlenmesine olanak tanır. İşaretleme işlemi tipik olarak glikanların sodyum borohidrit gibi bir indirgeyici madde ile indirgenmesini ve ardından indirgeyici ucun bir floresan boya ile etiketlenmesini içerir. Floresan boyalardan, 2-aminobenzamid (2-AB) ve 2-aminobenzoik asit (2-AA) glikan etiketleme için yaygın olarak kullanılan floresan boyalardandır [91]. Floresan etiketli glikanlar, CE, HPLC ve MS dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak analiz edilebilir [92]. Bu teknik, kısa sürede birden çok numunenin analizini mümkün kıldığından, özellikle yüksek verimli uygulamalar için kullanışlıdır. Floresan etiketleme aynı zamanda mikropilaka okuyucular, floresan mikroskoplar ve akış sitometreleri gibi çeşitli tespit sistemleriyle de uyumludur [93]. Avantajlarına rağmen, floresan etiketlemenin, floresan boyanın söndürülmesi (Quenching effects) veya floresan yoğunluğunun kalıcı olarak azalması (Photobleaching) da dahil olmak üzere bazı sınırlamaları vardır, bu da duyarlılığın azalmasına ve arka plan gürültüsünün artmasına neden olabilir [94, 95]. Etiketleme koşullarının dikkatli optimizasyonu ve flüoresan boya seçimi, sınırlamaları en aza indirmeye ve tekniğin hassasiyetini ve özgüllüğünü en üst düzeye çıkarmaya yardımcı olabilir [96].

Kütle etiketleme, kararlı izotopların veya kütleye özgü etiketlerin, MS kullanılarak tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için glikanlara eklenmesini içeren bir glikan etiketleme tekniğidir [97, 98]. Bu teknikte glikanlara, kararlı izotopların veya kütle etiketlerinin dahil edilmesi için enzimatik veya kimyasal modifiye işlemleri uygulanır. Etiketli glikanlar daha sonra, kütle/yük oranlarına göre etiketli glikanları tespit edebilen/ölçebilen MS ile analiz edilebilir. Kütle etiketi ekleme yöntemleri arasında, izotop kodlu afinite etiketleri (Isotope-coded affinity tag / ICAT), hücre kültüründe amino asitlerle kararlı izotop etiketleme (Stable isotope labeling using amino acids in cell culture / SILAC) ve tandem kütle etiketleri (Tandem mass tag / TMT) gibi farklı seçenekler bulunmaktadır [99, 100]. Kütle etiketleme, oldukça hassas ve spesifik bir glikan etiketleme yöntemidir ve bu, onu düşük miktarlardaki glikanların kantitatif olarak tanımlanması için ideal kılar. Bununla birlikte, teknik zaman alıcı olabilir ve özel ekipman gerektirir. Yeni kütle etiketleme yöntemlerinin geliştirilmesi, glikan analizi için mevcut araç yelpazesini genişletmeye olanak sağlayarak, karmaşık karbonhidrat moleküllerinin incelenmesini kolaylaştırabilir.

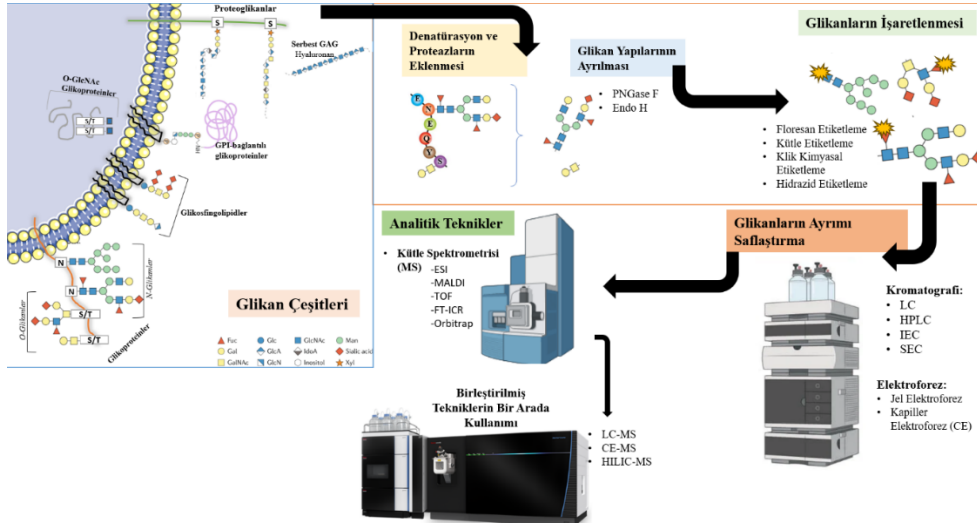
Hidrazid etiketleme, glikan indirgeme uçlarının hidrazid grupları ile türetilmesini içeren seçici bir glikan etiketleme tekniğidir [101]. Bu teknik, glikan içeren peptitlerin seçici analizine izin verdiği için glikoproteomik uygulamalarında özellikle yararlıdır [102]. Hidrazid etiketleme işlemi birkaç adım içerir. İlk olarak glikanlar, indirgeyici uçlarda aldehit grupları oluşturmak için sodyum periyodat gibi hafif bir oksitleyici ile oksitlenir. Oksitlenmiş glikanlar daha sonra hafif koşullar altında hidrazid bileşikleri, tipik olarak hidrazid işlevselleştirilmiş boncuklar veya katı destekler ile reaksiyona sokulur. Hidrazid grupları, aldehit grupları ile reaksiyona girerek kararlı hidrazin bağları oluşturur [103]. Hidrazid etiketleme, karmaşık biyolojik numunelerden glikan içeren peptitlerin seçici olarak yakalanmasını sağlar. İşaretleme reaksiyonundan sonra, glikan etiketli peptitler hidrazid işlevli katı desteğe bağlı kalırken, bağlanmamış peptidler ve kontaminantlar yıkanarak çıkarılabilir. Bağlı peptitler daha sonra LC ve MS gibi teknikler kullanılarak ayrıştırılabilir ve analiz edilebilir [104]. Hidrazid etiketlemenin bir avantajı, göreceli basitliği ve çok yönlü olmasıdır [105]. Özel ekipman gerektirmez ve piyasada bulunan hidrazid işlevli malzemelerle gerçekleştirilebilir. Ayrıca teknik, glikan içeren peptidlerin seçici analizine izin vererek glikoprotein bileşimi ve glikosilasyon modelleri hakkında değerli bilgiler sağlar. Bununla birlikte, hidrazid etiketlemesinin de bazı sınırlamaları vardır. Hidrazid reaktifleri ve diğer karbonil içeren moleküller arasında spesifik olmayan çapraz reaksiyonlar meydana gelebilir ve bu da hedef dışı etiketlemeye yol açar [30]. Bu istenmeyen etiketlemeyi en aza indirmek için işaretleme koşullarının dikkatli bir şekilde iyileştirilmesi ve uygun kontrollerin kullanılması gereklidir. Ayrıca, etiketleme reaksiyonunun verimliliği glikan yapısına ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak değişebilir ve bu da farklı glikanlar için özel optimizasyon gerektirir.

Klik kimyasal etiketleme, oldukça spesifik ve etkili bir glikan etiketleme yöntemidir [106]. Teknik, glikanları bir florofor veya başka bir saptanabilir grupta seçici olarak etiketleyen biyoortogonal reaksiyonların kullanımını içerir. Klik kimya reaksiyonu, kararlı bir triazol bağı oluşturmak üzere bir bakır katalizörün mevcudiyetinde birbirleriyle reaksiyona giren azitle ve alkinle modifiye edilmiş iki farklı molekülün kullanımını içerir [107]. Azit ve alkin grupları, kimyasal veya enzimatik modifikasyon yoluyla glikanlara dahil edilir ve karmaşık karışımlar içindeki spesifik glikanların etiketlenmesini sağlar [108]. Teknik aynı zamanda hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir, bu da onu yüksek verimli uygulamalar için kullanışlı hale getirir. Klik kimyasal etiketleme, biyolojik numunelerdeki glikanların görselleştirilmesi [109], MS ile glikanların tanımlanması ve miktarının belirlenmesi, ayrıca terapötik amaçlar için glikanların modifikasyonu dahil olmak üzere çok çeşitli uygulamalar için kullanılabilir [110]. Bu tekniğin bir avantajı, kantitatif etiketleme için yüksek verimliliğidir. Ayrıca, reaksiyon seçicidir ve işaretleme glikanların biyolojik aktivitesini koruyarak hafif koşullar altında gerçekleştirilebilir. Hem in vitro hem de in vivo uygulamalar için uygun olan bu teknik glikanların kendi doğal

ortamlarında incelenmesine olanak tanır [111]. Bununla birlikte, teknik, azit ve alkin ile değiştirilmiş glikanların kullanımı ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu dahil olmak üzere özel reaktifler ve uzmanlık gerektirir. Reaksiyon, bakır katalizörü engelleyebilen ditiyotritol (DTT) gibi indirgeyici maddelerin ortamdaki varlığından etkilenir [112]. Bu nedenle, klik kimyasal etiketlemenin başarısını sağlamak için deneysel koşullara dikkat edilmelidir.

Son olarak, enzimatik etiketleme, glikanlardaki şeker kalıntılarını transfer etmek veya değiştirmek için glikosiltransferazların veya glikosidazların kullanımını içeren bir glikan etiketleme tekniğidir [113, 114]. Bu teknik oldukça spesifik ve analitik veya terapötik amaçlar için spesifik glikanları etiketlemek/glikanları modifiye etmek için kullanılabilir [115]. Enzimatik etiketleme, enzimatik transfer ve enzimatik modifikasyon olmak üzere iki ana yaklaşımla elde edilebilir [116]. Enzimatik transferde, değiştirilmiş şeker kalıntısını bir glikan yapısına aktarmak için glikosiltransferaz enzimi kullanılır. Değiştirilmiş şeker kalıntısı, floresan boya veya biyotin kısım gibi saptanabilir bir gruba etiketlenebilir. Glikosiltransferaz enzimi spesifik şeker motiflerini tanır ve modifiye edilmiş şeker kalıntısının hedef glikan üzerine transferini katalize ederek etiketli glikan molekülünü oluşturur [117]. Enzimatik modifikasyon, belirli şeker bağlantılarını spesifik olarak tanıyan ve parçalayan çeşitli glikosidaz enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Enzimatik modifikasyonda, glikosidaz enzimleri, glikan yapısındaki belirli şeker kalıntılarını seçici olarak bölmek için kullanılır [31] ve bu da, parçalanma yerlerine değiştirilmiş şeker kalıntılarının eklenmesine izin verir. Modifiye edilmiş şeker kalıntıları, tespit edilebilir bir gruba etiketlenebilir veya glikanın fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek için modifiye edilebilir. Enzimatik etiketlemenin çeşitli avantajları vardır. Karmaşık karışımlar içindeki belirli glikanların seçici olarak etiketlenmesini veya değiştirilmesini sağladığından bu teknik oldukça spesiftir [118]. Enzimatik etiketleme aynı zamanda MS, LC ve floresan bazlı algılama teknikleri gibi çeşitli aşağı yönlü analitik yöntemlerle de uyumludur [119, 120]. Bunların yanında, enzimatik etiketlemenin bazı sınırlamaları da vardır. İşlem, istenen etiketleme veya modifikasyon reaksiyonları için spesifik glikosiltransferaz veya glikosidaz enzimlerinin mevcudiyetini gerektirir. Enzimatik reaksiyonların verimliliği, farklı glikanlar ve enzimler için optimizasyon gerektiren substrat özgüllüğü ve reaksiyon koşulları gibi faktörlere bağlı olarak da değişebilir. Dahası, enzimatik etiketleme işlemi, diğer etiketleme tekniklerine kıyasla çok sayıda adım içerebilir ve daha uzun reaksiyon süreleri gerektirebilir.

Glikan etiketleme tekniğinin seçimi, araştırmanın hedefleri, glikan örneklerinin doğası ve kullanılan analitik yöntemler gibi faktörlere bağlıdır. Glikanların doğru ve güvenilir analizini sağlamak için her tekniğin avantajlarını ve sınırlamalarını dikkate almak önemlidir.



Şekil 2. Genel bir glikan analizinde izlenecek aşamaların şematik bir gösterimi. GAG: Glikozaminoglikan; GPI: Glikosilfosfatidilinositol.

F. Glikan Analiz Verilerinin İşlenmesi ve Doğrulaması

Glikan analizinde veri işleme ve doğrulama, analitik tekniklerden elde edilen büyük miktardaki ham glikan verilerinin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamada oldukça önemlidir [121-125]. Bu süreçler, ham verileri önceden işlemek, analitik yöntemleri doğrulamak ve verilerin kalitesini değerlendirmek için çeşitli adımları içerir. Glikan analizinde veri işleme aşaması, veri temizleme, normalleştirme, hizalama ve özellik çıkarma da dahil olmak üzere birkaç adımı kapsar. Veri temizleme, veri kalitesini iyileştirmek için ham verilerden gürültü, yapaylık veya aykırı değerlerin çıkarılmasını içerir [126]. Numune hazırlama veya cihaz tepkisindeki farklılıklar gibi teknik varyasyonları hesaba katmak için normalizasyon gerçekleştirilir ve verilerin farklı numuneler veya deneyler arasında karşılaştırılabilmesi sağlanır [127]. Hizalama, ortak glikan yapılarının doğru bir şekilde karşılaştırılmasına ve tanımlanmasına izin vererek, farklı veri kümelerindeki bantları veya özellikleri hizalamada

çok önemlidir [128]. Özellik çıkarımı ise, MS veya kromatografi gibi çeşitli analitik teknikler kullanılarak elde edilebilen, spesifik glikan bantlarının veya ilgilenilen özelliklerin tanımlanmasını içerir [129, 130].

Glikan analizi verilerinin doğrulanması aşaması, kullanılan analitik yöntemlerin doğruluğunun, kesinliğinin, özgüllüğünün ve duyarlılığının değerlendirilmesine dayanır [131]. Analizden elde edilen verilerin güvenilir olması ve dolayısıyla gerçek glikan bileşiminin temsilini sağlar. Doğrulama, uygun kontrollerin, standartların ve kalite kontrol önlemlerinin kullanımı ile sağlanmaktadır. Validasyon ayrıca doğrusalılık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık gibi faktörleri göz önünde bulundurur [132]. Örneğin, glikan analizi sonuçları, referans standartlarla veya bilinen numunelerle karşılaştırarak doğrulanabilir [133, 134]. Kesinlik, kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği ölçülerek değerlendirilebilir. Spesifiklik, yöntemin yalnızca hedef glikanları tespit ettiği ve karışan maddeleri ayıklama durumu kesinleştirilerek doğrulanabilir. Duyarlılık ise, analitik yöntemin tespit limiti ve kantitasyonu belirlenerek değerlendirilebilir. Analitik yöntemin zaman içindeki performansını izlemek, tutarlı ve doğru sonuçlar sağlamak için kalite kontrol numuneleri ve tekrarlı analizler ile mümkün olabilmektedir [135].

İşleme, doğrulama ve düzeltmeye ek olarak glikan analizi, verilerden anlamlı içgörüler elde etmek için uygun istatistiksel yöntemlerin uygulanmasını da gerektirir. Bu yöntemler, çok değişkenli analiz [136], kümeleme (Cluster analysis / CA) [137], temel bileşen analizi (Principal component analysis / PCA) [138] ve makine öğrenimi algoritmalarını [139, 140] içerebilir. Genel olarak, glikan analizi, sonuçların doğruluğunu, güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini sağlamak için veri işleme, doğrulama ve düzeltmeye yönelik sistematik ve titiz bir yaklaşım gerektirir. Uygun yöntemlerin kullanılması, temel araştırma, teşhis ve terapötik geliştirmede glikan analizi verilerinin yorumlanmasını ve uygulanmasını daha da geliştirebilir.

III. UYGULAMA ALANLARI VE SONUÇ

Son yıllarda, glikan analiz teknikleri, temel biyoloji, klinik teşhis ve biyofarmasötik geliştirme dahil olmak üzere çeşitli araştırma alanlarında vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Hücrelerin ve proteinlerin yüzeylerini kaplayan karmaşık karbonhidratlar olan glikanların incelenmesi, ve bunların biyolojik süreçteki sayısız önemli rolleri, bu alana olan ilgiyi artırmaktadır. Yukarıda ayrıntıları açıklanan, MS ve kromatografi gibi gelişmiş tekniklerin kullanılması sayesinde, araştırmacılar glikanların karmaşık yapısını ve bileşimini benzeri görülmemiş bir hassasiyet ve ayrıntıyla inceleyebilme fırsatı bulmaktadırlar.

Temel araştırmalarda glikan analiz teknikleri, glikanların biyolojik sistemlerdeki işlevlerini ve rollerini araştırmak için yeni yollar açmıştır. Araştırmacılar, glikan bileşimindeki değişiklikleri tanımlayarak ve ölçerek, hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaları çözebilmekte ve glikanların biyolojik önemi hakkında daha derin bir anlayış kazanabilmektedirler [141]. Dahası, glikanlar ve lektinler arasındaki etkileşimlerin araştırılmasını sağlayan lektin bazlı analizler, hücre sinyali ve bağışıklık tepkileri gibi hücresel süreçlerin incelenmesinde de temel araçlar haline gelmiştir [142, 143].

Glikan analiz tekniklerinin klinik uygulamaları da geniştir [144]. Bu analiz tekniklerinin kullanımı, hastalık tespiti ve prognoz için gelecek vaad etmektedir. Kanser ve otoimmün bozukluklar dahil olmak üzere çok sayıda hastalıkta glikan yapısı ve bileşiminde belirli değişiklikler gözlemlenmiştir ve bu değişiklikler potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilir [145, 146]. Araştırmacılar, biyosıvırdaki veya dokulardaki glikan modellerini analiz ederek erken teşhis [147, 148], hastalık izleme ve kişiselleştirilmiş tıp [149] gibi alanlarda glikan bazlı biyobelirteçlerin belirlenmesine katkı sağlamaktadırlar [150].

Öte yandan, biyofarmasötik geliştirme alanında, terapötik proteinlerin kalitesini, etkinliğini ve güvenliğini sağlamak için glikan analiz teknikleri kullanılmaktadır [151]. Çok önemli bir post-translasyonel modifikasyon olan glikosilasyon, terapötik proteinlerin fonksiyonelliği ve farmakokinetiğinde çok önemli bir rol oynar [152]. Çeşitli glikan analiz teknikleri, bu proteinlerin glikosilasyon profilini izlemek ve optimize etmek için üretim süreci boyunca kullanılmaktadır. Ayrıca, glikan analiz teknikleri, terapötik protein etkinliğini arttırmak ve immünojenisiteyi azaltmak için glikosilasyon modellerini değiştirmeyi hedefleyen glikomühendislik alanında yaygın olarak kullanılmaktadır [153-155].

Sonuç olarak, glikan analiz teknikleri, glikobiyoloji biliminin ilerlemesinde çok önemli bir rol oynamakta, temel araştırma, klinik teşhis ve biyofarmasötik geliştirme dahil olmak üzere birçok alanda karbonhidratların biyolojik fonksiyonlarına ilişkin içgörüler sağlamaktadır. Teknolojideki gelişmelerle birlikte, glikanların yüksek verimli ve yüksek çözünürlüklü analizini mümkün kılan çok sayıda teknik geliştirilmiştir (Tablo 2). Her tekniğin avantajları ve sınırlamaları olmakla birlikte, glikan analizinde tekniğin seçimi araştırma sorusuna, örneğin karmaşıklığına ve mevcut kaynaklara bağlıdır. Tekniklerin sürekli geliştirilmesi ve iyileştirilmesiyle, glikan analizleri ile daha fazla bilgi elde etmek mümkün olacak; bu da sağlık ve tıp alanında yenilikçi gelişmeler için büyük fırsatlar sunacaktır.

Tablo 2. Glikan analizinde kullanılan birleştirilmiş teknikler.

Birleştirilmiş Analitik Teknikler	Avantajları	Dezavantajları	Kullanım Alanları
MALDI-TOF MS [22, 156, 157]	<ul style="list-style-type: none"> -Glikan kütlelerinin ve kompozisyonlarının hassas belirlenmesini sağlar. -Yüksek verimli glikan profillemesi için hızlı analiz imkanı sunar. -Genellikle basit örnek hazırlığı gerektirir. -Düşük yoğunluktaki glikan türlerini tespit etme yeteneğine sahiptir. -Glikan kütleleri, kompozisyonları ve dallanma desenleri hakkında bilgi sağlar. 	<ul style="list-style-type: none"> -Matris bileşenleri glikan sinyallerini etkileyebilir, tekrarlanabilirliği etkileyebilir. -Karmaşık örneklerde örtüşen sinyaller yorumu zorlaştırabilir. -Birlikte iyonlaşan bileşenler glikan sinyallerini baskılayabilir, niceliklendirmeyi etkileyebilir. -Büyük glikan yapılarını etkin bir şekilde iyonlaştıramayabilir, tespit hassasiyetini azaltabilir. 	<ul style="list-style-type: none"> -Nötr oligosakkaritler için oldukça uygun -Uygun matrisle birlikte negatif yüklü glikanlar için de kullanılabilir.
LC-ESI-MS [158, 159]	<ul style="list-style-type: none"> -Sıvı kromatografiyi ESI-MS ile birleştirerek glikan karışımlarını yüksek çözünürlükle ayırma olanağı sunar. -Düşük yoğunluğa sahip glikan türlerinin tespiti için yüksek hassasiyet sunar. -Glikan kompozisyonları, dallanma desenleri ve izomerik formlar hakkında detaylı yapısal bilgi sağlar. -Farklı glikan boyutları, yükleri ve karmaşıklıkları için uygundur, bu da yöntemi çok yönlü kılar. -Glikan türlerinin nicel analizine imkan tanır, göreceli bollukları anlama konusunda yardımcı olur. 	<ul style="list-style-type: none"> -Karmaşık glikan örnekleri geniş çaplı örnek hazırlığı gerektirebilir. -ESI verimliliği farklı glikan türleriyle değişebilir. -Birlikte iyonlanan bileşenler, glikan sinyallerini baskılayabilir ve niceliklendirme doğruluğunu etkileyebilir. -Yöntem, karmaşık enstrümantasyon ve uzmanlık gerektirir. -Benzer kütle/yük oranları nedeniyle glikan izomerleri arasındaki farkı ayırt etmek zor olabilir. - Analiz süresi MALDI-MS'ten çok daha yüksektir. 	<ul style="list-style-type: none"> -Her tür glikan çeşidinin saptanmasında kullanılabilir.
CE-ESI-MS [160-163]	<ul style="list-style-type: none"> - Yüksek ayırma verimliliği ve yüksek tespit hassasiyeti nedeniyle LC-ESI-MS'e alternatif bir teknik - Küçük örnek miktarlarıyla çalışabilme yeteneği, sınırlı örneğin kullanılması gereken durumlarda avantaj sağlar. 	<ul style="list-style-type: none"> - CE, pH, tampon bileşimi, polarite ve kapiller türüne duyarlıdır. Uygun olmayan koşullar, suboptimal sonuçlara hatta örneğin kaybına yol açabilir. - CE tampon bileşiminin ESI ile uyumluluğu gereklidir. 	<ul style="list-style-type: none"> -N ve O-glikanların saptanmasında, -Sialik asit ile modifiye glikanların analizinde, -Heterojen glikan yapılarının tespitinde kullanılabilir. - Glikopeptit düzeyinde Fc-glikosilasyonun karakterize edilmesi ve miktarının belirlenmesi.
RP-HPLC-MS [164, 165]	<ul style="list-style-type: none"> - Post-translasyonel modifikasyonlar, glikan profilleri, terminal varyantlar, dizi varyantları ve bozunma ürünleri de dahil olmak üzere nitel ve nicel olarak geniş bir yapısal bilgi dizisini sağlayabilir. 	<ul style="list-style-type: none"> - MS iyonizasyon verimliliği, farklı glikan türleri arasında farklılık gösterebilir. - Spesifik glikan sınıfları için RP-HPLC koşullarının optimizasyonu zaman alıcı olabilir. 	<ul style="list-style-type: none"> -Sialik asit ile modifiye edilmiş glikanların analizi -N-glikan karakterizasyonu
HILIC-MS [166, 167]	<ul style="list-style-type: none"> - Glikanlar yüksek derecede hidrofilik olduklarından, HILIC-MS, doğal ve indirgeyici uç etiketli glikanları analiz etmek için en iyi yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. -Glikanları izomerik olarak ayırabilmektedir. -Tipik antikör glikanları için yüksek seçiciliğe sahiptir -Farklı kolon tipleri kullanılarak analizi yapılan glikanlar çeşitlendirilebilir. 	<ul style="list-style-type: none"> - HILIC-MS, izomerik glikan çalışmaları için kullanılmasına rağmen, nispeten düşük çözünürlük, karmaşık biyolojik numunelerde uygulanmasını engellebilmektedir. - Benzer polariteye sahip glikanları ayırmak zor olabilir. 	<ul style="list-style-type: none"> -Glikan izomerlerinin ayrımı -Hidrofilik glikanların analizi

KAYNAKLAR

- [1] Hart, G. W., & Copeland, R. J. (2010). Glycomics hits the big time. *Cell*, 143(5), 672-676.
- [2] Kleene, R., & Schachner, M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 195-208.
- [3] Molinari, M. (2007). N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nature Chemical Biology*, 3(6), 313-320.
- [4] Garner, O. B., & Baum, L. G. (2008). Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1472-1477.

- [5] Varki, A. (2017). Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3-49.
- [6] Brockhausen, I. (2006). Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports*, 7(6), 599-604.
- [7] Lattová, E., Skříčková, J., Hausnerová, J., Frola, L., Křen, L., Ihnatová, I., Zdráhal, Z., Bryant, J., & Popovič, M. (2020). N-Glycan profiling of lung adenocarcinoma in patients at different stages of disease. *Modern Pathology*, 33(6), 1146-1156.
- [8] Shimodaira, K., Nakayama, J., Nakamura, N., Hasebe, O., Katsuyama, T., & Fukuda, M. (1997). Carcinoma-associated expression of core 2 β -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: role of O-glycans in tumor progression. *Cancer Research*, 57(23), 5201-5206.
- [9] Irvine, E. B., & Alter, G. (2020). Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. *Glycobiology*, 30(4), 241-253.
- [10] Mettu, R., Chen, C.-Y., & Wu, C.-Y. (2020). Synthetic carbohydrate-based vaccines: challenges and opportunities. *Journal of Biomedical Science*, 27, 1-22.
- [11] Kumbhar, P. S., Pandya, A. K., Manjappa, A. S., Disouza, J. I., & Patravale, V. B. (2021). Carbohydrates-based diagnosis, prophylaxis and treatment of infectious diseases: Special emphasis on COVID-19. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100052.
- [12] Eichler, J. (2019). Protein glycosylation. *Current Biology*, 29(7), R229-R231.
- [13] Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A., & Vlassara, H. (1993). Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6434-6438.
- [14] Flynn, R. A., Pedram, K., Malaker, S. A., Batista, P. J., Smith, B. A., Johnson, A. G., George, B. M., Majzoub, K., Villalta, P. W., & Carette, J. E. (2021). Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell*, 184(12), 3109-3124. e3122.
- [15] Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., & Dwek, R. A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*, 25, 21-50.
- [16] Wang, Z., Zhu, J., & Lu, H. (2020). Antibody glycosylation: impact on antibody drug characteristics and quality control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1905-1914.
- [17] Indelicato, R., & Trinchera, M. (2021). Epigenetic Regulation of Glycosylation. *The Role of Glycosylation in Health and Disease*, 173-186.
- [18] Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(6), 346-366.
- [19] Marshall, R. (1972). Glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry*, 41(1), 673-702.
- [20] Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N., & Suroliya, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(3), 156-163.
- [21] Watanabe, Y., Bowden, T. A., Wilson, I. A., & Crispin, M. (2019). Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1863(10), 1480-1497.
- [22] Pabst, M., & Altmann, F. (2011). Glycan analysis by modern instrumental methods. *Proteomics*, 11(4), 631-643.
- [23] Sperandio, M., Gleissner, C. A., & Ley, K. (2009). Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunological Reviews*, 230(1), 97-113.
- [24] Jensen, P. H., Kolarich, D., & Packer, N. H. (2010). Mucin-type O-glycosylation—putting the pieces together. *The FEBS Journal*, 277(1), 81-94.
- [25] Mulloy, B., Hart, G. W., & Stanley, P. (2009). Structural analysis of glycans. *Essentials of Glycobiology 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), Chapter 47.
- [26] Ongay, S., Boichenko, A., Govorukhina, N., & Bischoff, R. (2012). Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *Journal of Separation Science*, 35(18), 2341-2372.
- [27] Kosanović, M., Milutinović, B., Goč, S., Mitić, N., & Janković, M. (2017). Ion-exchange chromatography purification of extracellular vesicles. *Biotechniques*, 63(2), 65-71.
- [28] Alvarez-Manilla, G., Atwood III, J., Guo, Y., Warren, N. L., Orlando, R., & Pierce, M. (2006). Tools for glycoproteomic analysis: size exclusion chromatography facilitates identification of tryptic glycopeptides with N-linked glycosylation sites. *Journal of Proteome Research*, 5(3), 701-708.
- [29] Dwek, R. A., Edge, C. J., Harvey, D. J., Wormald, M. R., & Parekh, R. B. (1993). Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 65-100.
- [30] Ruhaak, L., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A., & Wuhrer, M. (2010). Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 3457-3481.
- [31] Marino, K., Bones, J., Kattla, J. J., & Rudd, P. M. (2010). A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 713-723.

- [32] Qing, G., Yan, J., He, X., Li, X., & Liang, X. (2020). Recent advances in hydrophilic interaction liquid interaction chromatography materials for glycopeptide enrichment and glycan separation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115570.
- [33] Kozlik, P., Vaclova, J., & Kalikova, K. (2021). Mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography–Separation potential in peptide analysis. *Microchemical Journal*, 165, 106158.
- [34] Cummins, P. M., Rochfort, K. D., & O'Connor, B. F. (2017). Ion-exchange chromatography: basic principles and application. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, 209-223.
- [35] Szabo, Z., Thayer, J. R., Agroskin, Y., Lin, S., Liu, Y., Srinivasan, K., ... & Pohl, C. (2017). In-depth analyses of native N-linked glycans facilitated by high-performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection coupled to mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(12), 3089-3101.
- [36] Zhou, J. X., Dermawan, S., Solamo, F., Flynn, G., Stenson, R., Tressel, T., & Guhan, S. (2007). pH-conductivity hybrid gradient cation-exchange chromatography for process-scale monoclonal antibody purification. *Journal of Chromatography A*, 1175(1), 69-80.
- [37] Akash, M. S. H., Rehman, K., Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2020). High performance liquid chromatography. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, 175-184.
- [38] Campbell, M. P., Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A., & Rudd, P. M. (2008). GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics*, 24(9), 1214-1216.
- [39] Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156.
- [40] Andrade-Eiroa, A., Le-Cong, T., Nguyen, M.-L., & Dagaut, P. (2011). Reverse-high performance liquid chromatography mechanism explained by polarization of stationary phase. *CheM*, 1, 62-79.
- [41] Ni, W. (2013). Advances in protein post-translational modifications (PTMS) using liquid chromatography-mass spectrometry. Doctoral dissertation, Northeastern University, Department of Chemistry and Chemical Biology, College of Science.
- [42] Selman, M. H., Derks, R. J., Bondt, A., Palmblad, M., Schoenmaker, B., Koeleman, C. A., van de Geijn, F. E., Dolhain, R. J., Deelder, A. M., & Wührer, M. (2012). Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. *Journal of Proteomics*, 75(4), 1318-1329.
- [43] Prater, B. D., Connelly, H. M., Qin, Q., & Cockrill, S. L. (2009). High-throughput immunoglobulin G N-glycan characterization using rapid resolution reverse-phase chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 385(1), 69-79.
- [44] Wührer, M., de Boer, A. R., & Deelder, A. M. (2009). Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 28(2), 192-206.
- [45] Gutierrez Reyes, C. D., Jiang, P., Donohoo, K., Atashi, M., & Mechref, Y. S. (2021). Glycomics and glycoproteomics: Approaches to address isomeric separation of glycans and glycopeptides. *Journal of Separation Science*, 44(1), 403-425.
- [46] McCalley, D. V. (2017). Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1523, 49-71.
- [47] Mariño, K., Lane, J. A., Abrahams, J. L., Struwe, W. B., Harvey, D. J., Marotta, M., Hickey, R. M., & Rudd, P. M. (2011). Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labeling and hydrophilic interaction chromatography. *Glycobiology*, 21(10), 1317-1330.
- [48] Zauner, G., Koeleman, C. A., Deelder, A. M., & Wührer, M. (2010). Protein glycosylation analysis by HILIC-LC-MS of Proteinase K-generated N- and O-glycopeptides. *Journal of Separation Science*, 33(6-7), 903-910.
- [49] Iwaki, J., & Hirabayashi, J. (2018). Carbohydrate-binding specificity of human galectins: an overview by frontal affinity chromatography. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 30(172), SE137-SE153.
- [50] Monzo, A., Bonn, G. K., & Guttman, A. (2007). Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 423-432.
- [51] Tateno, H., Nakamura-Tsuruta, S., & Hirabayashi, J. (2007). Frontal affinity chromatography: sugar-protein interactions. *Nature Protocols*, 2(10), 2529-2537.
- [52] Cummings, R. D., Etzler, M., Hahn, M. G., Darvill, A., Godula, K., Woods, R. J., & Mahal, L. K. (2022). Glycan-recognizing probes as tools. *Essentials of Glycobiology 4th ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), Chapter 48.
- [53] Suzuki, S. (2013). Recent developments in liquid chromatography and capillary electrophoresis for the analysis of glycoprotein glycans. *Analytical Sciences*, 29(12), 1117-1128.
- [54] Haslam, S. M., Freedberg, D. I., Mulloy, B., Dell, A., Stanley, P., & Prestegard, J. H. (2022). Structural Analysis of Glycans. *Essentials of Glycobiology 4th ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), Chapter 50.
- [55] Lu, G., Crihfield, C. L., Gattu, S., Veltri, L. M., & Holland, L. A. (2018). Capillary electrophoresis separations of glycans. *Chemical Reviews*, 118(17), 7867-7885.

- [56] Geyer, H., & Geyer, R. (2006). Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(12), 1853-1869.
- [57] Dave, M. B., Dherai, A. J., Udani, V. P., Hegde, A. U., Desai, N. A., & Ashavaid, T. F. (2018). Comparison of transferrin isoform analysis by capillary electrophoresis and HPLC for screening congenital disorders of glycosylation. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(1), e22167.
- [58] Morelle, W., & Michalski, J.-C. (2007). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2(7), 1585-1602.
- [59] North, S. J., Hitchen, P. G., Haslam, S. M., & Dell, A. (2009). Mass spectrometry in the analysis of N-linked and O-linked glycans. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(5), 498-506.
- [60] Zauner, G., Koeleman, C. A., Deelder, A. M., & Wuhler, M. (2012). Mass spectrometric O-glycan analysis after combined O-glycan release by beta-elimination and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(9), 1420-1428.
- [61] Tie, C., & Zhang, X.-X. (2012). A new labelling reagent for glycans analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytical Methods*, 4(2), 357-359.
- [62] Suttapitugsakul, S., Sun, F., & Wu, R. (2019). Recent advances in glycoproteomic analysis by mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 92(1), 267-291.
- [63] Zhou, S., Wooding, K. M., & Mechref, Y. (2017). Analysis of permethylated glycan by liquid chromatography (LC) and mass spectrometry (MS). *High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols*, 83-96.
- [64] Hu, Y., & Mechref, Y. (2012). Comparing MALDI-MS, RP-LC-MALDI-MS and RP-LC-ESI-MS glycomic profiles of permethylated N-glycans derived from model glycoproteins and human blood serum. *Electrophoresis*, 33(12), 1768-1777.
- [65] Stadlmann, J., Pabst, M., Kolarich, D., Kunert, R., & Altmann, F. (2008). Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics*, 8(14), 2858-2871.
- [66] Sparbier, K., Asperger, A., Resemann, A., Kessler, I., Koch, S., Wenzel, T., Stein, G., Vorwerk, L., Suckau, D., & Kostrzewa, M. (2007). Analysis of glycoproteins in human serum by means of glycospecific magnetic bead separation and LC-MALDI-TOF/TOF analysis with automated glycopeptide detection. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 18(4), 252.
- [67] Otto, V. I., Damoc, E., Cueni, L. N., Schürpf, T., Frei, R., Ali, S., Callewaert, N., Moise, A., Leary, J. A., & Folkers, G. (2006). N-glycan structures and N-glycosylation sites of mouse soluble intercellular adhesion molecule-1 revealed by MALDI-TOF and FTICR mass spectrometry. *Glycobiology*, 16(11), 1033-1044.
- [68] Wuhler, M., Koeleman, C. A., Hokke, C. H., & Deelder, A. M. (2004). Nano-scale liquid chromatography-mass spectrometry of 2-aminobenzamide-labeled oligosaccharides at low femtomole sensitivity. *International Journal of Mass Spectrometry*, 232(1), 51-57.
- [69] Ceroni, A., Maass, K., Geyer, H., Geyer, R., Dell, A., & Haslam, S. M. (2008). GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *Journal of Proteome Research*, 7(4), 1650-1659.
- [70] Apte, A., & Meitei, N. S. (2010). Bioinformatics in glycomics: Glycan characterization with mass spectrometric data using SimGlycan™. *Functional Glycomics: Methods and Protocols*, 269-281.
- [71] Liu, M.-Q., Zeng, W.-F., Fang, P., Cao, W.-Q., Liu, C., Yan, G.-Q., Zhang, Y., Peng, C., Wu, J.-Q., & Zhang, X.-J. (2017). pGlyco 2.0 enables precision N-glycoproteomics with comprehensive quality control and one-step mass spectrometry for intact glycopeptide identification. *Nature communications*, 8(1), 438.
- [72] Dotz, V., Haselberg, R., Shubhakar, A., Kozak, R. P., Falck, D., Rombouts, Y., Reusch, D., Somsen, G. W., Fernandes, D. L., & Wuhler, M. (2015). Mass spectrometry for glycosylation analysis of biopharmaceuticals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 1-9.
- [73] Battistel, M. D., Azurmendi, H. F., Yu, B., & Freedberg, D. I. (2014). NMR of glycans: shedding new light on old problems. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 79, 48-68.
- [74] Lundborg, M., & Widmalm, G. (2011). Structural analysis of glycans by NMR chemical shift prediction. *Analytical Chemistry*, 83(5), 1514-1517.
- [75] Fellenberg, M., Çoksezen, A., & Meyer, B. (2010). Characterization of picomole amounts of oligosaccharides from glycoproteins by ¹H NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(26), 2630-2633.
- [76] Broberg, A., Thomsen, K. K., & Duus, J. Ø. (2000). Application of nano-probe NMR for structure determination of low nanomole amounts of arabinoxylan oligosaccharides fractionated by analytical HPAEC-PAD. *Carbohydrate Research*, 328(3), 375-382.
- [77] Łowicki, D., Czarny, A., & Mlynarski, J. (2013). NMR of carbohydrates. *Nuclear Magnetic Resonance*, 383-419.

- [78] Malkina, O., Hricovini, M., Bizik, F., & Malkin, V. (2001). Chemical Shifts and Spin– Spin Coupling Constants in Me α -d-Xylopyranoside: A DFT Approach. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(40), 9188-9195.
- [79] Wormald, M. R., Petrescu, A. J., Pao, Y.-L., Glithero, A., Elliott, T., & Dwek, R. A. (2002). Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling. *Chemical Reviews*, 102(2), 371-386.
- [80] Pollex-Krüger, A., Meyer, B., Stuike-Prill, R., Sinnwell, V., Matta, K. L., & Brockhausen, I. (1993). Preferred conformations and dynamics of five core structures of mucin type O-glycans determined by NMR spectroscopy and force field calculations. *Glycoconjugate Journal*, 10, 365-380.
- [81] Kumar, A., Narayanan, V., & Sekhar, A. (2019). Characterizing post-translational modifications and their effects on protein conformation using NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 59(1), 57-73.
- [82] Liang, P.-H., Wu, C.-Y., Greenberg, W. A., & Wong, C.-H. (2008). Glycan arrays: biological and medical applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 86-92.
- [83] Gao, J., Ma, L., Liu, D., & Wang, Z. (2012). Microarray-based technology for glycomics analysis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 15(1), 90-99.
- [84] Fittolani, G., Shanina, E., Guberman, M., Seeberger, P. H., Rademacher, C., & Delbianco, M. (2021). Automated Glycan Assembly of 19F-labeled Glycan Probes Enables High-Throughput NMR Studies of Protein–Glycan Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(24), 13302-13309.
- [85] Song, X., Xia, B., Lasanajak, Y., Smith, D. F., & Cummings, R. D. (2008). Quantifiable fluorescent glycan microarrays. *Glycoconjugate Journal*, 25, 15-25.
- [86] Shinohara, Y., & Furukawa, J.-i. (2014). Surface Plasmon Resonance as a Tool to Characterize Lectin–Carbohydrate Interactions. *Lectins: Methods and Protocols*, 185-205.
- [87] Day, C. J., Poole, J., Pluschke, G., & Jennings, M. P. (2022). Investigation of Mycobacterium ulcerans Glycan Interactions Using Glycan Array and Surface Plasmon Resonance. *Mycobacterium ulcerans: Methods and Protocols*, 29-40.
- [88] Kim, Y., Hyun, J. Y., & Shin, I. (2022). Glycan microarrays from construction to applications. *Chemical Society Reviews*.
- [89] Belický, Š., Katrlík, J., & Tkáč, J. (2016). Glycan and lectin biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 37-47.
- [90] Domann, P. J., Pardos-Pardos, A. C., Fernandes, D. L., Spencer, D. I. R., Radcliffe, C. M., Royle, L., Dwek, R. A., & Rudd, P. M. (2007). Separation-based glycoprofiling approaches using fluorescent labels. *Proteomics*, 7(S1), 70-76.
- [91] Bigge, J., Patel, T., Bruce, J., Goulding, P., Charles, S., & Parekh, R. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Analytical Biochemistry*, 230(2), 229-238.
- [92] Kamoda, S., Nakano, M., Ishikawa, R., Suzuki, S., & Kakehi, K. (2005). Rapid and sensitive screening of N-glycans as 9-fluorenylmethyl derivatives by high-performance liquid chromatography: a method which can recover free oligosaccharides after analysis. *Journal of Proteome Research*, 4(1), 146-152.
- [93] Wu, X., & Bruchez, M. P. (2004). Labeling cellular targets with semiconductor quantum dot conjugates. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 75, pp. 171-183). Elsevier.
- [94] Johansson, M. K., & Cook, R. M. (2003). Intramolecular dimers: a new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chemistry–A European Journal*, 9(15), 3466-3471.
- [95] Sapsford, K. E., Berti, L., & Medintz, I. L. (2006). Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor–acceptor combinations. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(28), 4562-4589.
- [96] Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., Person, B., Heilemann, M., Sauer, M., & Tinnefeld, P. (2008). A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(29), 5465-5469.
- [97] Hahne, H., Neubert, P., Kuhn, K., Etienne, C., Bomgarden, R., Rogers, J. C., & Kuster, B. (2012). Carbonyl-reactive tandem mass tags for the proteome-wide quantification of N-linked glycans. *Analytical chemistry*, 84(8), 3716-3724.
- [98] Zhong, X., Chen, Z., Snovida, S., Liu, Y., Rogers, J. C., & Li, L. (2015). Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for quantitative analysis of glycans labeled with multiplex carbonyl-reactive tandem mass tags. *Analytical Chemistry*, 87(13), 6527-6534.
- [99] Iliuk, A., Galan, J., & Tao, W. A. (2009). Playing tag with quantitative proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 503-513.
- [100] Zhu, W., Smith, J. W., & Huang, C.-M. (2009). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.

- [101] Walker, S. H., Taylor, A. D., & Muddiman, D. C. (2013). Individuality normalization when labeling with isotopic glycan hydrazide tags (INLIGHT): a novel glycan-relative quantification strategy. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(9), 1376-1384.
- [102] Sun, Z., Qin, H., Wang, F., Cheng, K., Dong, M., Ye, M., & Zou, H. (2012). Capture and dimethyl labeling of glycopeptides on hydrazide beads for quantitative glycoproteomics analysis. *Analytical Chemistry*, 84(20), 8452-8456.
- [103] Huang, J., Qin, H., Sun, Z., Huang, G., Mao, J., Cheng, K., Zhang, Z., Wan, H., Yao, Y., & Dong, J. (2015). A peptide N-terminal protection strategy for comprehensive glycoproteome analysis using hydrazide chemistry based method. *Scientific Reports*, 5(1), 1-15.
- [104] Zeng, X., Hood, B. L., Sun, M., Conrads, T. P., Day, R. S., Weissfeld, J. L., Siegfried, J. M., & Bigbee, W. L. (2010). Lung cancer serum biomarker discovery using glycoprotein capture and liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 9(12), 6440-6449.
- [105] Zhang, Y., Hu, Z., Zhang, C., Liu, B.-F., & Liu, X. (2020). A robust glycan labeling strategy using a new cationic hydrazide tag for MALDI-MS-based rapid and sensitive glycomics analysis. *Talanta*, 219, 121356.
- [106] Best, M. D. (2009). Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry*, 48(28), 6571-6584.
- [107] Gil, M. V., Arévalo, M. J., & Lopez, O. (2007). Click chemistry-what's in a name? Triazole synthesis and beyond. *Synthesis*, 2007(11), 1589-1620.
- [108] Zhang, X., & Zhang, Y. (2013). Applications of azide-based bioorthogonal click chemistry in glycobiology. *Molecules*, 18(6), 7145-7159.
- [109] Liu, B. (2019). Bio-orthogonal click chemistry for in vivo bioimaging. *Trends in Chemistry*, 1(8), 763-778.
- [110] Smeekens, J. M., Chen, W., & Wu, R. (2014). Mass spectrometric analysis of the cell surface N-glycoproteome by combining metabolic labeling and click chemistry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(4), 604-614.
- [111] Kim, E., & Koo, H. (2019). Biomedical applications of copper-free click chemistry: in vitro, in vivo, and ex vivo. *Chemical Science*, 10(34), 7835-7851.
- [112] McKay, C. S., & Finn, M. (2014). Click chemistry in complex mixtures: bioorthogonal bioconjugation. *Chemistry & Biology*, 21(9), 1075-1101.
- [113] Park, S., Lee, M.-R., & Shin, I. (2008). Chemical tools for functional studies of glycans. *Chemical Society Reviews*, 37(8), 1579-1591.
- [114] Lopez Aguilar, A., Briard, J. G., Yang, L., Ovryn, B., Macauley, M. S., & Wu, P. (2017). Tools for studying glycans: recent advances in chemoenzymatic glycan labeling. *ACS Chemical Biology*, 12(3), 611-621.
- [115] Lindhout, T., Iqbal, U., Willis, L. M., Reid, A. N., Li, J., Liu, X., Moreno, M., & Wakarchuk, W. W. (2011). Site-specific enzymatic polysialylation of therapeutic proteins using bacterial enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18), 7397-7402.
- [116] Rashidian, M., Dozier, J. K., & Distefano, M. D. (2013). Enzymatic labeling of proteins: techniques and approaches. *Bioconjugate Chemistry*, 24(8), 1277-1294.
- [117] Moremen, K. W., & Haltiwanger, R. S. (2019). Emerging structural insights into glycosyltransferase-mediated synthesis of glycans. *Nature Chemical Biology*, 15(9), 853-864.
- [118] Wu, Z. L., & Ertelt, J. M. (2022). Endoglycosidase assay using enzymatically synthesized fluorophore-labeled glycans as substrates to uncover enzyme substrate specificities. *Communications Biology*, 5(1), 501.
- [119] Bynum, M. A., Yin, H., Felts, K., Lee, Y. M., Monell, C. R., & Killeen, K. (2009). Characterization of IgG N-glycans employing a microfluidic chip that integrates glycan cleavage, sample purification, LC separation, and MS detection. *Analytical Chemistry*, 81(21), 8818-8825.
- [120] Zhang, S., Li, W., Lu, H., & Liu, Y. (2017). Quantification of N-glycosylation site occupancy status based on labeling/label-free strategies with LC-MS/MS. *Talanta*, 170, 509-513.
- [121] Temme, J. S., & Gildersleeve, J. C. (2022). General strategies for glycan microarray data processing and analysis. *Glycan Microarrays: Methods and Protocols*, 67-87.
- [122] Shah, B., Jiang, X. G., Chen, L., & Zhang, Z. (2014). LC-MS/MS peptide mapping with automated data processing for routine profiling of N-glycans in immunoglobulins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 25(6), 999-1011.
- [123] Jansen, B. C., Reiding, K. R., Bondt, A., Hipgrave Ederveen, A. L., Palmblad, M., Falck, D., & Wuhrer, M. (2015). MassyTools: a high-throughput targeted data processing tool for relative quantitation and quality control developed for glycomic and glycoproteomic MALDI-MS. *Journal of Proteome Research*, 14(12), 5088-5098.

- [124] Artemenko, N. V., Campbell, M. P., & Rudd, P. M. (2010). GlycoExtractor: a web-based interface for high throughput processing of HPLC-glycan data. *Journal of Proteome Research*, 9(4), 2037-2041.
- [125] Bao, B., Kellman, B. P., Chiang, A. W., Zhang, Y., Sorrentino, J. T., York, A. K., Mohammad, M. A., Haymond, M. W., Bode, L., & Lewis, N. E. (2021). Correcting for sparsity and interdependence in glycomics by accounting for glycan biosynthesis. *Nature Communications*, 12(1), 4988.
- [126] Lacher, N. A., Roberts, R. K., He, Y., Cargill, H., Kearns, K. M., Holovics, H., & Ruesch, M. N. (2010). Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs. *Journal of Separation Science*, 33(2), 218-227.
- [127] Uh, H.-W., Klarić, L., Ugrina, I., Lauc, G., Smilde, A. K., & Houwing-Duistermaat, J. J. (2020). Choosing proper normalization is essential for discovery of sparse glycan biomarkers. *Molecular Omics*, 16(3), 231-242.
- [128] Misra, B. B., & van der Hoof, J. J. (2016). Updates in metabolomics tools and resources: 2014–2015. *Electrophoresis*, 37(1), 86-110.
- [129] Chang, D., & Zaia, J. (2022). Methods to improve quantitative glycoprotein coverage from bottom-up LC-MS data. *Mass Spectrometry Reviews*, 41(6), 922-937.
- [130] Gillet, L. C., Navarro, P., Tate, S., Röst, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., & Aebersold, R. (2012). Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(6).
- [131] Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2012). Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of Chromatography A*, 1232, 101-109.
- [132] Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2224-2234.
- [133] Trbojević-Akmačić, I., Ugrina, I., & Lauc, G. (2017). Comparative analysis and validation of different steps in glycomics studies. In *Methods in Enzymology* (Vol. 586, pp. 37-55). Elsevier.
- [134] Campbell, M. P., Nguyen-Khuong, T., Hayes, C. A., Flowers, S. A., Alagesan, K., Kolarich, D., Packer, N. H., & Karlsson, N. G. (2014). Validation of the curation pipeline of UniCarb-DB: building a global glycan reference MS/MS repository. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844(1), 108-116.
- [135] Yuwono, M., & Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32, 243-259.
- [136] Arbogast, L. W., Delaglio, F., Schiel, J. E., & Marino, J. P. (2017). Multivariate analysis of two-dimensional ¹H, ¹³C methyl NMR spectra of monoclonal antibody therapeutics to facilitate assessment of higher order structure. *Analytical Chemistry*, 89(21), 11839-11845.
- [137] Taichrib, A., Pioch, M., & Neusüß, C. (2012). Multivariate statistics for the differentiation of erythropoietin preparations based on intact glycoforms determined by CE-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 797-805.
- [138] Planinc, A., Dejaegher, B., Heyden, Y. V., Viaene, J., Van Praet, S., Rappez, F., Van Antwerpen, P., & Delporte, C. (2017). LC-MS analysis combined with principal component analysis and soft independent modelling by class analogy for a better detection of changes in N-glycosylation profiles of therapeutic glycoproteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 477-485.
- [139] Bojar, D., Powers, R. K., Camacho, D. M., & Collins, J. J. (2021). Deep-learning resources for studying glycan-mediated host-microbe interactions. *Cell Host & Microbe*, 29(1), 132-144. e133.
- [140] Li, H., Chiang, A. W., & Lewis, N. E. (2022). Artificial intelligence in the analysis of glycosylation data. *Biotechnology Advances*, 108008.
- [141] Xiao, H., Suttapitugsakul, S., Sun, F., & Wu, R. (2018). Mass spectrometry-based chemical and enzymatic methods for global analysis of protein glycosylation. *Accounts of Chemical Research*, 51(8), 1796-1806.
- [142] Gupta, G., Surolia, A., & Sampathkumar, S.-G. (2010). Lectin microarrays for glycomic analysis. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 14(4), 419-436.
- [143] Das, A. K., Ghosh, N., Mandal, A., & Sil, P. C. (2022). Glycobiology of cellular expiry: decrypting the role of glycan-lectin regulatory complex and therapeutic strategies focusing on cancer. *Biochemical Pharmacology*, 115367.
- [144] Trbojević-Akmačić, I., Lageveen-Kammeijer, G. S., Heijs, B., Petrović, T., Deris, H., Wuhler, M., & Lauc, G. (2022). High-throughput glycomic methods. *Chemical Reviews*, 122(20), 15865-15913.
- [145] Kailemia, M. J., Park, D., & Lebrilla, C. B. (2017). Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 395-410.
- [146] Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 540-555.
- [147] Taniguchi, N., Hancock, W., Lubman, D. M., & Rudd, P. M. (2009). The second golden age of glycomics: from functional glycomics to clinical applications. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 425-426.

- [148] Rho, J.-h., Ladd, J. J., Li, C. I., Potter, J. D., Zhang, Y., Shelley, D., Shibata, D., Coppola, D., Yamada, H., & Toyoda, H. (2018). Protein and glycomic plasma markers for early detection of adenoma and colon cancer. *Gut*, 67(3), 473-484.
- [149] Etzebarria, J., & Reichardt, N.-C. (2016). Methods for the absolute quantification of N-glycan biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(8), 1676-1687.
- [150] Li, J., Zhang, J., Xu, M., Yang, Z., Yue, S., Zhou, W., Gui, C., Zhang, H., Li, S., & Wang, P. G. (2022). Advances in glycopeptide enrichment methods for the analysis of protein glycosylation over the past decade. *Journal of Separation Science*, 45(16), 3169-3186.
- [151] Planinc, A., Bones, J., Dejaegher, B., Van Antwerpen, P., & Delporte, C. (2016). Glycan characterization of biopharmaceuticals: updates and perspectives. *Analytica Chimica Acta*, 921, 13-27.
- [152] Jenkins, N., Murphy, L., & Tyther, R. (2008). Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Molecular Biotechnology*, 39, 113-118.
- [153] Papanthasiou, M. M., & Kontoravdi, C. (2020). Engineering challenges in therapeutic protein product and process design. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 27, 81-88.
- [154] Dicker, M., & Strasser, R. (2015). Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(10), 1501-1516.
- [155] Agatemor, C., Buettner, M. J., Ariss, R., Muthiah, K., Saeui, C. T., & Yarema, K. J. (2019). Exploiting metabolic glycoengineering to advance healthcare. *Nature Reviews Chemistry*, 3(10), 605-620.
- [156] Dong, X., Huang, Y., Cho, B. G., Zhong, J., Gautam, S., Peng, W., ... & Mechref, Y. (2018). Advances in mass spectrometry-based glycomics. *Electrophoresis*, 39(24), 3063-3081.
- [157] Ng, E. W., Wong, M. Y., & Poon, T. C. (2014). Advances in MALDI mass spectrometry in clinical diagnostic applications. *Chemical Diagnostics: From Bench to Bedside*, 139-175.
- [158] Pabst, M., & Altmann, F. (2008). Influence of electrosorption, solvent, temperature, and ion polarity on the performance of LC-ESI-MS using graphitic carbon for acidic oligosaccharides. *Analytical Chemistry*, 80(19), 7534-7542.
- [159] Yu, A., Zhao, J., Peng, W., Banazadeh, A., Williamson, S. D., Goli, M., ... & Mechref, Y. (2018). Advances in mass spectrometry-based glycoproteomics. *Electrophoresis*, 39(24), 3104-3122.
- [160] Wu, H., & Tang, K. (2020). Highly sensitive and robust capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: Interfaces, preconcentration techniques and applications. *Reviews in Analytical Chemistry*, 39(1), 45-55.
- [161] Helena, H., Ivona, V., Roman, Ř., & František, F. (2022). Current applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biologically important analytes in urine (2017 to mid-2021): A review. *Journal of Separation Science*, 45(1), 305-324.
- [162] Gomes, F. P., & Yates III, J. R. (2019). Recent trends of capillary electrophoresis-mass spectrometry in proteomics research. *Mass Spectrometry Reviews*, 38(6), 445-460.
- [163] Giorgetti, J., D'atri, V., Canonge, J., Lechner, A., Guillarme, D., Colas, O., ... & François, Y. N. (2018). Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis-Mass spectrometry: Assessment and method validation. *Talanta*, 178, 530-537.
- [164] Jin, W., Wang, C., Yang, M., Wei, M., Huang, L., & Wang, Z. (2019). Glycoqueuing: Isomer-specific quantification for sialylation-focused glycomics. *Analytical Chemistry*, 91(16), 10492-10500.
- [165] Chen, X., & Flynn, G. C. (2007). Analysis of N-glycans from recombinant immunoglobulin G by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 370(2), 147-161.
- [166] Peng, W., Gutierrez Reyes, C. D., Gautam, S., Yu, A., Cho, B. G., Goli, M., ... & Mechref, Y. (2023). MS-based glycomics and glycoproteomics methods enabling isomeric characterization. *Mass Spectrometry Reviews*, 42(2), 577-616.
- [167] Yang, X., & Bartlett, M. G. (2019). Glycan analysis for protein therapeutics. *Journal of Chromatography B*, 1120, 29-40.