

FOSFOPEPTİTLERİN ÇÖZÜNMEYEN GEÇİŞ METAL
OKSİTLERİ ÜZERİNDE SEÇİMLİ ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE
MALDI-MS İLE DOĞRUDAN TAYİNLERİ

SELECTIVE PHOSPHOPEPTIDE ENRICHMENT ON
INSOLUBLE TRANSITION METAL OXIDES AND DIRECT
DETERMINATION BY MALDI-MS

GİZEM KAYNAR

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

KABUL VE ONAY

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Gizem Kaynar' ın hazırladığı 'Fosfopeptitlerin Çözünmeyen Geçiş Metal Oksitleri Üzerinde Seçimli Zenginleştirilmesi ve MALDI-MS ile Doğrudan Tayinleri' adlı bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan


Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

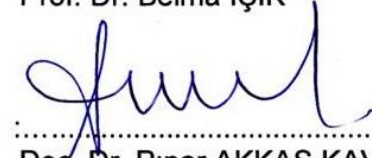
Üye (Danışman)


Prof. Dr. Bekir SALİH

Üye


Prof. Dr. Belma IŞIK

Üye


Doç. Dr. Pınar AKKAŞ KAVAKLI

Üye


Doç. Dr. Gökhan DEMİREL

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

_ / _ / 2013

Gizem Kaynar

ÖZET

FOSFOPEPTİTLERİN ÇÖZÜNMEYEN GEÇİŞ METAL OKSİTLERİ ÜZERİNDE SEÇİMLİ ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE MALDI-MS İLE DOĞRUDAN TAYİNLERİ

GİZEM KAYNAR

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. BEKİR SALİH

Temmuz 2013, 82 sayfa

Hücre sel faaliyetlerin düzenlenmesi, post-translasyonel modifikasyonlar ile gerçekleşmektedir. Bu modifikasyonlardan en sık rastlanana ise fosforilasyondur. Protein yapılarının fosforilasyonu, fosfat grubunun bir veya daha fazla amino asite tersinir bir şekilde kovalent olarak bağlanmasıdır. Hangi proteinin ne zaman, nerede ve kim tarafından fosfatlanacağına anlaşılması birçok hücre içi sinyal iletim mekanizmasının anlaşılmasında anahtar rol oynamaktadır. Hücre sel faaliyetlerde görev alan fosfoproteinlerin yapılarının aydınlatılması için günümüzde en etkin teknik olarak kütle spektrometrisi kullanılmaktadır. Fakat fosfopeptitlerin kütle spektrometrik analizler için oldukça önemli bir parametre olan iyonlaşma verimlerinin ve hücre içerisindeki proteinlerin fosfatlanma yüzdelerinin düşük olması nedeniyle oluşacak fosfopeptit birimlerinin miktarları, analiz için kullanılacak olan kütle spektrometrik tekniklerin tayin sınırlarının altında kalmaktadır. Bu sorunların çözülmesi amacıyla fosfopeptitlerin kütle spektrometrisi ile analiz edilmeden önce buldukları ortamdan seçimli olarak ayrılıp belli bir yerde toplanarak, zenginleştirme çalışmaları yapılması gereklidir.

Bu tez kapsamında; β -kazein proteininin ve yağsız inek sütü örneklerinin enzimatik olarak parçalanmasından elde edilen peptit birimleri içerisinde pozitif yüklü nikel, bakır, kobalt, demir, gadolinyum, disprosiyum, vanadyum, molibden gibi geçiş metallerinin oksitleri kullanılarak saflaştırılan fosfopeptitler Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırılmalı-Kütle Spektrometrisi (MALDI-MS) ile incelenmiştir. Fosfopeptitler ile geçiş metali

oksitleri arasındaki etkileşimler, fosfopeptit yapılarında yer alan negatif yüklü fosfat grupları ile pozitif yüklü metaller arasında meydana gelmektedir. Bu etkileşimler sayesinde fosfopeptitler, enzimatik parçalanma sonucu oluşan peptit karışımı içerisinde özgün olarak ayrılıp, kullanılan geçiş metal oksitlerinin yüzeyleri üzerinde zenginleştirilmiştir. Zenginleştirilen fosfopeptitlerin doğrudan, kullanılan geçiş metal oksitlerinin yüzeylerinden kütle spektrometrik olarak analizleri yapılmıştır ve bu veriler, fosfopeptitler zenginleştirildikleri geçiş metal oksidi üzerinden desorbe edildikten sonra yapılan kütle spektrometrik analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda desorpsiyon basamağına ihtiyaç olmadığı ve fosfopeptitlerin, kullanılan geçiş metal oksitlerinin yüzeyinden aynı başarı ile doğrudan kütle spektrometrik analizlerinin yapılabileceği tespit edilmiş ve bu yöntemin fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fosfopeptit, post-translasyonel modifikasyon, fosfopeptit zenginleştirme, MALDI-MS, metal oksit, fosfopeptit-metal oksit etkileşimleri.

ABSTRACT

SELECTIVE PHOSHOPEPTIDE ENRICHMENT ON INSOLUBLE TRANSITION METAL OXIDES AND DIRECT DETERMINATION BY MALDI-MS

GİZEM KAYNAR

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. BEKİR SALİH

July 2013, 82 pages

Post-translational modifications organize cellular activities. One of the most common post-translational modifications is phosphorylation. Phosphorylation is the reversible covalent attachment of one or more phosphate groups to the protein structure. It is important to know which protein phosphorylates, or when the phosphorylation begins, for understanding intracellular signal transduction mechanism. Nowadays, mass spectrometry is used as the most efficient technique for characterizing phosphoproteins taking charge in cellular processes. However, phosphopeptides have low ionization efficiency which is a very important parameter for mass spectrometry. Furthermore, the concentration of phosphopeptides is usually lower than the detection limit of mass spectrometric techniques because of the substoichiometric phosphorylation. Therefore, selective enrichment and preconcentration is required to overcome all these issues before the mass spectrometric analysis of phosphopeptides.

Within the scope of this thesis, phosphopeptides in peptide mixtures, obtained from the enzymatic digestion of β -casein and milk samples, were selectively enriched and purified with positively charged transition metal oxides such as nickel, copper, cobalt, iron, dysprosium and gadolinium, vanadium oxides. Moreover, these phosphopeptides were determined directly on transition metal oxide surfaces by MALDI-MS after the enrichment process. Then, data obtained from these experiments were compared with the MALDI-MS analysis results obtained after desorption of the phosphopeptides from the transition metal

oxide surfaces using elution process. This comparison showed that the elution of the phosphopeptides from the surfaces of metal oxides is not required prior to their mass spectrometric analysis. Thus, phosphopeptides could be directly detected on transition metal oxide surfaces as well as their detection after desorption. Also the same method is very useful after enrichment of phosphopeptides from complex real biological samples such as non-fat milk.

Keywords: Phosphopeptides, post-translational modification, phosphopeptide enrichment, MALDI-MS, metal oxide, phosphopeptide-metal oxide interactions.

TEŞEKKÜR

Bilgi birikimi, ahlaki ve insani yönüyle lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana ışık tutan, sabrını ve hoşgörüsünü benden ve tüm diğer öğrencilerinden esirgemeyen, büyük bir alçak gönüllülük ve mütevazılıkla kimya bilgime ve laboratuvar tecrübeme büyük katkısı olan, sadece kimya alanında değil her alanda tecrübelerine başvurduğum, yanında çalışmaktan gurur ve onur duyduğum değerli hocam sayın Prof. Dr. Bekir Salih'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübesine ne zaman ihtiyaç duysam yanımda olan ve değerli tavsiyelerini benden esirgemeyen, ahlaki ve insani yönüyle bana her zaman örnek olan laboratuvarıda bizi her daim motive eden ve destekleyen sevgili hocam sayın Doç. Dr. Ömür Çelikkıçak'a ne kadar teşekkür etsem azdır.

SAREG ekibine ilk katıldığım günden beri bana çok destek olan, mütevazılığı ve yardımsever mizacı ile tavsiye ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, gerek hocalığı gerek dostluğu ile her zaman yanımda olan, tez çalışmalarına çok büyük katkısı olan, laboratuvarıda bana verdiği desteğe ne kadar teşekkür etsem az olan hocam, Arş. Gör. Mehmet Atakay'a her zaman minnettar kalacağım.

Laboratuvarıda geçirdiğim süreyi keyifli kılan, ne zaman bir problemle karşılaşsam bilgi birikimleri ve desteklerini benden esirgemeyen, güler yüzleri ve sohbetleri ile beni her zaman motive eden Arş. Gör. H. Mehmet Kayılı, Aslı Çal, Ayşegül Özgen, Arş. Gör. Ülkü Güler, Funda Yıldırım, Selim Gerişlioğlu, Burak Tavşanlı, Selin Özdemir, Hande Kabadayı ve tüm SAREG ekibine teşekkür ederim.

Tanıdığım günden beri benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, ne zaman ihtiyacım olsa bana yardım etmek için elinden gelen her şeyi fazlasıyla yapan, tez çalışmalarım süresince neşesi ve desteği ile bana en büyük motivasyonu sağlayan, yanımda olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim Can Öztürk'e teşekkür ederim.

Hayatta attığım her adımda bana destek olan ve inanıp güvenen, hep daha ileriye gidebilmem için bana yol gösteren, eğitimim ve geleceğim için hiçbir fedakarlıktan asla kaçınmayan, kazandığım her başarıda en büyük paya sahip olan, ailem olmalarından dolayı her zaman çok büyük onur ve gurur duyduğum, sevgilerinin bana güç verdiği, bana yaşam veren, hayatta her şeyden çok sevdiğim ve değer verdiğim biricik aileme sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
β	Beta
mL	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
pmol	Pikomol

Kısaltmalar

ABC	Amonyum bikarbonat
ACN	Asetonitril
ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
BSA	Sığır Serum Albumin
CI	Kimyasal iyonlaştırma
DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
DTT	Ditiyotreitol
EI	Elektron Bombardımanlı
ESI	Elektro Sprey iyonlaşmalı
FAB	Hızlı atom bombardımanlı
FT	Fourier transform
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IAA	İyodoasetamid

IMAC	İmmobilize edilmiş metal iyon afinite kromatografisi
LD	Lazer desorpsiyonu
LIT	Lineer iyon tuzağı
m/z	Kütle/yük
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon / İyonlaştırılmalı
MOAC	Metal oksit afinite kromatografisi
MS	Kütle Spektrometresi/Spektrometrisi
pSer	Fosfoserin
pThr	Fosfotreonin
PTM	Post-translayonel modifikasyon
pTyr	Fosfotirozin
QIT	Dörtkutuplu İyon Yakalayıcı
Q-TOF	Dörtkutuplu-uçuş-zamanlı
SIMS	İkincil iyon kütle spektrometrisi
TFA	Trifloro asetik asit
TOF	Uçuş zamanlı
UV	Ultraviyole

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ETİK.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Proteomiks.....	4
2.2. Post-translasyonel Modifikasyon (PTM).....	5
2.2.1. Fosforilasyona Bağlı Post-translasyonel Modifikasyon.....	10
2.3. Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.....	14
2.3.1. Protein Saflaştırması.....	14
2.3.2. Protein Karakterizasyonu.....	15
2.4. Kütle Spektrometrisi.....	15
2.4.1. Kütle Spektrometrisi Çalışma Prensibi.....	17
2.4.2. Kütle Spektrometrisinde İyon Kaynakları.....	18
2.4.3. Kütle Ayırıcıları.....	21
2.4.4. En Çok Tercih Edilen Yeni Nesil Kütle Spektrometreleri.....	23
2.5. Fosfoproteomiks.....	26
2.5.1. Kütle Spektrometrisinin Fosfoproteomikte Kullanılması.....	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28

3.1.	Kullanılan Kimyasallar	28
3.2.	Kullanılan Cihazlar	28
3.2.1.	pH Metre.....	28
3.2.2.	Deiyonize Su Sistemi	28
3.2.3.	Vortex	28
3.2.4.	Santrifüj	29
3.2.5.	MALDI Kütle Spektrometrisi.....	29
3.3.	MALDI Kütle Spektrometrisi Örnek Hazırlama	29
3.4.	Enzimatik Parçalama	29
3.5.	Fosfopeptit Zenginleştirilmesi	30
3.5.1.	Fosfopeptit Zenginleştirilmesinde En Özgün Davranan Metal Oksitlerin Tespit Edilmesi.....	30
3.5.2.	Demir (III) oksit Kullanılarak Fosfopeptit Zenginleştirme Çalışmaları.....	30
3.5.3.	β -kazein/Bovine Serum Albumin (BSA) Karışımı Kullanılarak	31
3.5.4.	İnek Sütü Örneği Kullanılarak.....	31
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	33
4.1.	Fosfopeptitlerin Zenginleştirilmesi için En Uygun Metal Oksitlerinin Belirlenmesi.....	34
4.2.	Fosfopeptitlerin Metal Oksit Yüzeyinde Zenginleştirilmesi için En Uygun pH'nın Tespit Edilmesi.....	42
4.3.	Fosfopeptitlerin Metal Oksit Yüzeyinde Zenginleştirilmesi ve Doğrudan Metal Oksit Yüzeyinden Analizleri	44
4.4.	Fosfopeptitlerin Metal Oksit Yüzeyinden Desorbe Olmasına pH Etkisi.....	45
4.5.	Fosfopeptitlerin MALDI-MS ile Analizinin Çözeltide ve Metal Oksit Yüzeyinde Analizinin Karşılaştırılması.....	48
4.6.	Metal Oksitlerin, Fosfopeptitlerin Özgün Ayrılması ve Zenginleştirilmesindeki Etkinliği	49

4.7. Fosfopeptitlerin Kütle Spektrometrik Koşullar Altındaki Kararlılığının Metal Oksit Yüzeyinde ve Desorpsiyon Çözeltisinde Karşılaştırılması.....	51
4.8. Fosfopeptitlerin β -kazein ile Karışık ve Derişik BSA Triptik Parçalanma Çözeltisi İçerisinden Zenginleştirilmesi	53
4.9. Yağsız İnek Sütünden Demir (III) oksit Kullanılarak Fosfopeptit Zenginleştirilmesi.....	54
5. SONUÇLAR.....	58
6. KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Proteomiks ve Genomiks	5
Şekil 2.2. En sık rastlanılan post-translasyonel modifikasyonlar	9
Şekil 2.3. ATP varlığında kinaz enzimi katalizi ile serin aminoasidinin fosforilasyonu ...	11
Şekil 2.4. Fosfatlanmış serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin kimyasal yapıları.	11
Şekil 2.5. Sinyal iletim ağı ve fosforilasyon-defosforilasyon ilişkisi.	12
Şekil 2.6. Sinyal iletim basamaklarının şematik gösterimi	13
Şekil 2.7. Kütle spektrometrisi analiz basamakları.	18
Şekil 2.8. Dört kutuplu kütle ayırıcısının şematik gösterimi	21
Şekil 2.9. Uçuş zamanlı bir kütle ayırıcısının çalışma prensibinin şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.10. MALDI çalışma prensibinin şematik gösterimi	25
Şekil 2.11. Elektrosprey çalışma prensibinin şematik gösterimi.....	26
Şekil 4.1. Bakır (II) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	35
Şekil 4.2. Nikel (II) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	36
Şekil 4.3. Zirkonyum (II) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	37
Şekil 4.4. Talyum (III) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	37
Şekil 4.5. Demir (III) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	38
Şekil 4.6. Disproporsiyum (III) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.....	38
Şekil 4.7. Gadalinyum (III) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.....	39

Şekil 4.8. Vanadyum (V) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	39
Şekil 4.9. Çinko (II) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	40
Şekil 4.10. Tantal (V) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	41
Şekil 4.11. Molibden (VI) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.	41
Şekil 4.12. β -kazein enzimatik parçalanma çözeltisi içerisinde (A) pH=1,0'da, (B) pH=1,5'te, (C) pH=2,0'da, (D) pH=2,5'te, (E) pH=3,0'da ve (F) pH=4,0'da yapılan fosfopeptit adsorpsiyonları sonrası Demir (III) oksit yüzeyleri. İşaretli pikler fosfopeptitleri göstermektedir.	43
Şeki 4.13. β -kazein peptit çözeltisinin pozitif iyon ve lineer moda alınmış MALDI-MS spektrumları. (A) Doğrudan çözeltiden ve (B) çözeltinin Demir (III) oksit ile muamelesinden sonra Demir (III) oksit yüzeyinden.	45
Şekil 4.14. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu (A) pH=8,0'de desorpsiyon sonrası demir oksit yüzeyi, (B) pH=8,0'de demir oksit yüzeyinden desorbe edilen desorpsiyon çözeltisi, (C) pH=8,0'deki desorpsiyon sonrası pH=11,0' e çekilerek yapılan desorpsiyonun çözeltisi ve (D) pH=11,0'de desorpsiyon sonrası demir oksit yüzeyi. * ile gösterilenler ise fosfopeptitlere ait, * * ile gösterilen fosfopeptitin çift yüklü haline ait sinyallerdir.	47
Şekil 4.15. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu. (A) pH=1,5'te β -kazein içerisinde özgün fosfopeptit zenginleştirilmesi sonucu demir oksit yüzeyi, (B) pH=11,0'de desorpsiyon sonrası desorpsiyon çözeltisi. * ile işaretlenen pikler fosfopeptitleri göstermektedir.	48
Şekil 4.16. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu β -kazein içerisinde özgün zenginleştirme sonrası (A) demir oksit yüzeyi, (B) nikel oksit yüzeyi ve (C) zirkonyum oksit yüzeyi. * ile gösterilen pikler fosfopeptitlere aittir.	50

Şekil 4.17. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu β -kazein içerisinden özgün zenginleştirme sonrası (A) pH=1,5'te zirkonyum oksit yüzeyi ve (B) pH 11,0' de desorpsiyon çözeltisi. PP'ler fosfopeptitleri göstermektedir. 52

Şekil 4.18. pozitif iyon lineer mod MALDI kütle spektrumu (A) β -kazein enzimatik parçalanma çözeltisi, BSA enzimatik parçalanma çözeltisi karışımı ve (B) pH=1,5' te özgün zenginleştirme sonrası pH=11,0' da desorpsiyon çözeltisi. * fosfopeptitleri, * * ise fosfopeptitlerin çift yüklü halini göstermektedir. 54

Şekil 4.19. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu (A) yağsız inek sütünün triptik parçalanma çözeltisi, (B) demir oksit ile özgün fosfopeptit zenginleştirilmesi sonrası desorpsiyon çözeltisi ve (C) özgün fosfopeptit zenginleştirilmesi sonrası demir oksit yüzeyi. Numaralar yağsız inek sütü içerisinde bulunan, Tablo 4.2' de verilen fosfopeptitleri göstermektedir. 57

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: Bazı temel modifikasyon türleri ve özellikleri.....	7
Tablo 2.2: İyonlaşma teknikleri.....	20
Tablo 4.1: β -kazeinin tripsin enzimi ile seçimli parçalanması sonucu elde edilen fosfopeptitlerin monoizotopik kütleleri ve amino asit dizilimleri.....	42
Tablo 4.2: Yağsız inek sütünün enzimatik parçalanması sonucu elde edilen fosfopeptitlerin monoizotopik kütleleri ve amino asit dizilimleri.....	55

1. GİRİŞ

Proteomiks olarak adlandırılan bilim dalı genomun tüm protein bileşenlerinin analizlerini ve tanımlanmalarını kapsar. Proteom çalışmaları, protein faaliyetlerinin, yapılarındaki modifikasyonların, hücre içerisindeki fonksiyonlarının ve protein-protein etkileşimlerinin tanımlanmasını amaçlar. Ancak proteom çalışmaları genom çalışmalarından daha zordur. Genom çalışmaları dört ana bileşen üzerinden yürürken proteom çalışmaları 20 değişik amino asitin farklı dizilimlerinin oluşturduğu peptit ve proteinlerin incelenmesini kapsar. Bunlara bir de post-traslasyonel modifikasyonlar eklenince proteom çalışmalarının ne kadar karmaşık olabileceği anlaşılır. Hastalıklı ve normal koşullardaki protein fonksiyonlarının veya miktarlarının karşılaştırılmasıyla ilaç tasarımı, yeni tedavi yöntemleri geliştirme çalışmaları yapılabilir veya hastalıkların teşhisi için yeni yöntemler geliştirilebilir.

Post-traslasyonel modifikasyonlar sonucunda amino asitlerin dolayısıyla peptit ve proteinlerin fiziksel özellikleri değişir. Bu değişiklikleri incelemek sinyal iletiminin açıklanmasına yardımcı olur. Fakat birçok post-traslasyonel modifikasyonun hücrel aktivite, tepki verme ve gelişim mekanizmalarındaki rolleri, hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu yüzden post-traslasyonel modifikasyonları incelemek ve mekanizmalarını aydınlatmak önemlidir. Protein yapılarında yaklaşık 300 farklı post-traslasyonel modifikasyonun meydana geldiği bilinmektedir. Post-traslasyonel modifikasyonlardan en sık rastlanılanları; glikolizasyon, asetilasyon ve özellikle fosforilasyondur. Protein yapılarının fosforilasyonu, fosfat grubunun bir veya daha fazla amino asite tersinir, kovalent bağlanması ile olup hücrel faaliyetlerin düzenlenmesinde en sık rastlanılan post-traslasyonel modifikasyondur. Fosfat grubunun tüm amino asitler içinde en fazla bağlandıkları üç amino asit; serin, treonin ve tirozin amino asitleridir. Fosforilasyonun serin ve treonin amino asitleri üzerinden olma olasılığı, tirozin amino asidi üzerinden olması olasılığından çok daha fazladır. Bağlı olarak bu olasılıkların oranları pSer: pThr: pTyr sırasıyla 1800:200:1 olarak ifade edilmektedir. Hangi proteinin ne zaman, nerede ve kim tarafından fosfatlanacağını anlaşılması birçok hücre içi sinyal iletim mekanizmasının anlaşılmasında anahtar rol oynamaktadır. Birbirine göre tersinir olarak çalışan kinaz ve fosfataz enzimleri proteinlerin fosforilasyon ve defosforilasyon işlemlerini düzenlerler. Bu iki enzim sistemi kinetik özellikleri, substrat seçicilikleri ve hücre veya

doku içerisindeki dağılımları bakımından farklıdır. Birçok kinaz enzimi de kendi başlarına fosfoproteinlerdir ve sadece fosfatlandıklarında aktif hale gelirler. Kinaz ve fosfataz enzimleri, fosforilasyon olayını kontrol altında tutarak, sonrasında gerçekleşen; protein fonksiyonlarının baştan sona değişmesi, proteinlerin, hücre içerisinde buldukları yerin belirlenmesi, yapılarının bozunması, konformasyonlarının değişmesi ve diğer proteinlerle etkileşmesi gibi biyolojik faaliyetleri de düzenlemiş olurlar. Hücre döngüsünün düzenlenmesi, membran taşıması ve geçirgenliği, hücreler arası etkileşim ve metabolizma gibi biyolojik fonksiyonların ayarlanmasında da fosforilasyon çok önemli rol oynamaktadır. Bu konuda yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar, kanser, diyabet, Alzheimer, kistik fibrozis gibi hücresel mekanizma bozuklukları sebebiyle meydana gelen hastalıkların tanımlanmaları ve bu tür hastalıkların tedavisi amacıyla yeni ilaç hedeflerinin bulunması gibi çalışmalar için çok büyük öneme sahiptir.

Son on yılda kütle spektrometrisi, daha geleneksel fosforilasyon analiz metotlarına geçerli bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır [1]. Matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/iyonlaşmalı uçuş zamanlı (MALDI-TOF) ve elektrosprey iyonlaşmalı kuadrupol uçuş zamanlı (ESI-QTOF) kütle spektrometrisi yöntemleri, fosfoproteomiks çalışmaları için en uygun tekniklerdir. Fakat fosfopeptitlerin kütle spektrometrik analizler için oldukça önemli bir parametre olan iyonlaşma verimleri düşüktür. Ayrıca hücre içerisindeki proteinlerin fosfatlanma yüzdelerinin düşük olması nedeniyle oluşacak fosfopeptit birimlerinin miktarları, kullanılan kütle spektrometrik tekniklerin tayin sınırlarının altında kalmaktadır. Bahsedilen bu gibi sorunların üstesinden gelebilmek amacıyla, özellikle karmaşık örnekler için, fosfat grubu içeren türlerin zenginleştirilmesi ve tayin duyarlılıklarının artırılması için çok çeşitli teknikler geliştirilmektedir [2]. Bu sorunların çözülmesi amacıyla fosfopeptitlerin kütle spektrometresi ile analiz edilmeden önce buldukları ortam içerisinde seçimli olarak ayrılıp belli bir yerde toplanarak miktarlarının artırıldığı önzenginleştirme çalışmaları yapılmaktadır.

Bu çalışmalarda sıklıkla kullanılmakta olan immobilize edilmiş metal-iyon afinite kromatografisi (IMAC) ve metal oksit afinite kromatografisi [MOAC] gibi yöntemler, fosfopeptitler üzerindeki fosfat grupları ile metal iyonları arasındaki kovalent olmayan özgün etkileşimlere dayanmaktadır. Başka bir yöntem olarak İmmüno çöktürme (immunoprecipitation); fosfatlanmış türlere özgü antikolar, fosfopeptitler haricindeki tüm proteinlerin çöktürülerek ortamdan uzaklaştırılmasını sağlarlar. Bu yöntem, fosfotirozin

içeren proteinlerin zenginleştirilmelerinde fosfoserin, fosfotreonin içeren proteinlere oranla daha yaygındır. Ancak fosfoproteinlerin bu yöntemle zenginleştirilmeleri için pahalı antikör karışımları kullanmak gerekmektedir. Bu yüzden bu yöntemle yapılan çalışmaların sayısı sınırlıdır. Fosfopeptitlerin veya fosfoproteinlerin seçimli olarak zenginleştirilme yöntemlerinden bir diğeri ise fosfat gruplarının kimyasal modifikasyonlarının yapılmasıdır. Bu yöntemde β -eliminasyonu ve eş zamanlı Michael katılması ile gerçekleşen kimyasal modifikasyon fosfopeptitlerin afinite prensibi ile saflaştırılmaları amacı ile kullanılır. Ancak bu yöntemin, istenmeyen yan reaksiyonlar, fazla miktarda örnek gereksinimi, tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Bu tez kapsamında, ilk olarak β -kazein çözültisinin enzimatik parçalanması sonucu oluşan peptitler içerisinde, fosfopeptitleri seçimli olarak hangi metal oksit daha iyi ayırdığı tespit edilmiştir. Bu amaçla pozitif yüklü nikel, bakır, kobalt, demir, gadolinyum, disprosiyum gibi geçiş metalleri denenmiştir. Kullanılan geçiş metal oksitlerinden fosfopeptitlere en yüksek seçimli etki gösterenin Demir (III) oksit olduğu anlaşılmış ve fosfopeptitlerin Demir (III) oksit yüzeyine hangi pH'da daha seçimli adsorbe olduğu ve hangi pH'da daha kolay desorbe edildiğine dair pH taraması çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra β -kazein ve BSA'nın enzimatik parçalanma çözültileri karıştırılmış ve bu karışım içerisinde Demir (III) oksit kullanılarak fosfatlanmış peptitlerin zenginleştirme çalışması yapılmıştır. Son adımda süt örneğinin enzimatik parçalanması sonucu oluşan peptitler içerisinde fosfatlanmış peptitler Demir (III) oksit kullanılarak ayrılmış ve direkt Demir (III) oksit yüzeyinden MALDI-MS ile analiz edilmiştir. Tüm bu çalışmalarda zenginleştirme sonrası MALDI-MS ile analiz direkt zenginleştirme için kullanılan geçiş metal oksitlerinin yüzeylerinden yapılmıştır. Bu sonuçlar, geçiş metal oksiti kullanılarak zenginleştirilen fosfopeptitler, geçiş metal oksitlerinin yüzeyinden desorbe edildikten sonra MALDI-MS ile yapılan analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Böylelikle fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılacak yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

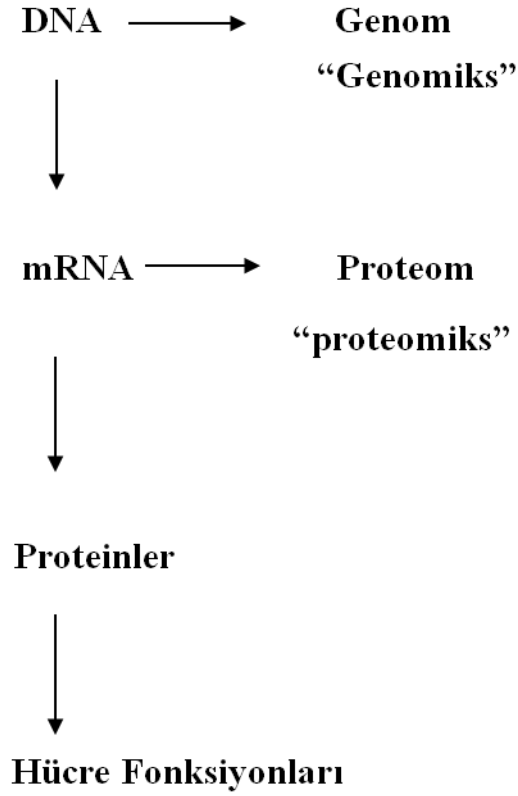
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Proteomiks

Proteomiks son 20 yıldır sürekli gelişen ve önemi artan bir çalışma alanıdır. İlk olarak Wilkins, 1995 yılında 'proteom' ve 'proteomiks' terimlerini kullanmıştır [3]. Proteomiks genel olarak, canlı organizmaların yaşamsal bileşeni olan proteinlerin, yani proteomun, yapı ve fonksiyonunu inceleyen çalışma alanıdır. Proteomikste proteinlerin yapılarında meydana gelen değişimler, aktiviteleri, birbirleri arasındaki etkileşimleri, fonksiyonları ve buna bağlı olarak hücre içerisindeki yerleri incelenebilir.

Proteomiksi genomiksten ayıran nokta, genomiks 4 farklı yapı taşının, dizilimini, yapısını, fonksiyonlarını ve mutasyonlarını DNA düzeyinde incelerken, proteomiks 20 farklı aminoasitin farklı dizilimlerinden oluşan proteinlerin tek tek dizilimi, fonksiyonu, aktif bölgesi, işlevi, post-translasyonel modifikasyonları, hücre içerisindeki yeri ve görevini inceler. Genom statiktir. Yani bir canlı organizmanın her hücresinde aynı olan bir sistemdir. Proteom ise dinamiktir. Dolayısıyla hücredeki bir proteinin bağlı çokluğu, post-translasyonel modifikasyonu, hücrenin fizyolojik ve çevresel şartlarına bağlı olarak değişir [4]. Ayrıca tek bir gen birçok protein izoformu içinde kodlanmış olabilir. Bu yüzden proteomiks, genomiksdan çok daha karmaşık ve zordur. Buna karşın proteomiks, genomiksdan çok daha fazla bilgi verir çünkü DNA dizilimini bilmek proteinlerin fonksiyonu veya bir biyolojik işlemin nasıl gerçekleştiği hakkında bilgi veremezken proteomiks sayesinde bu bilgiler elde edilebilir. Dolayısıyla genomiks tek başına bir biyolojik sistemi açıklamak için yeterli değildir.

Proteomiks ile protein biyokimyası çalışmaları da yine birbirinden farklı çalışma alanlarıdır. Protein kimyası, protein yapısı ve fonksiyonlarını fiziksel biyokimya veya mekanistik enzimoloji alanları altında inceler. Protein kimyası çalışmalarında tek bir proteinin yapısı incelenir ve yapısı ile fonksiyonu ilişkilendirilir. Proteomiks ise daha karmaşık örneklerin incelenmesini kapsar. Bir protein sistemindeki tüm proteinlerin yapıları incelenerek buldukları sistemdeki işlevleri bu yapılar ile ilişkilendirilir. Yani proteomiks, tek bir yapıya bağlı sonuçlara değil sistemlerin davranışlarının açıklanması ile ilgili veriler ve sonuçlara odaklıdır. Böylece biyolojik sistemlerin yapıları ve işlevleri tanımlanabilir.



Şekil 2.1. Proteomiks ve Genomiks [5]

Proteomiks bu kadar karmaşık ve zahmetli olmasına rağmen daha çok tercih edilmesinin bazı sebepleri vardır. Proteinlerin görev aldıkları mekanizmadaki işlevi ve aktivitesi geçirdiği post-translasyonel modifikasyona bağlıdır [5] ve yalnızca proteini sentezleyen mesajcı RNA'nın (mRNA) yapısı incelenerek bunlar tayin edilemez. Protein yapısındaki post-translasyonel modifikasyonun türü ve modifikasyondan sonra proteinin aktivitesindeki değişimi incelemek için proteomiks gereklidir.

2.2. Post-translasyonel Modifikasyon (PTM)

İnsan proteomunda 1.000.000'dan fazla protein bulunur, buna karşın insan genomunda 30.000 gen vardır. Yani insan proteomu, kendisine karşılık gelen genomundan 2-3 kat karmaşıktır [6]. Proteomun, genomdan çok daha karmaşık olmasının sebebi büyük ölçüde post-translasyonel modifikasyonlardan (Post-translational modifications, PTMs)

kaynaklanmaktadır. Günümüzde protein yapılarında meydana gelebilen yaklaşık 300 farklı kovalent modifikasyon bilinmektedir [2]. Bu modifikasyonlardan en sık rastlananları Tablo1 de gösterilmiştir. Bu modifikasyonlarla proteinler, aktive olup olmamalarına bağlı olarak bazı fonksiyonlar kazanabilmektedirler [7]. Ayrıca post-translasyonel modifikasyonlar, proteinlerin yapısını kararlı kılmakta ve enzim aktivitesini düzenlemekte rol oynayabilir.

Post-translasyonel modifikasyon, mesajcı RNA'nın (mRNA) translasyonu sonucu sentezlenen proteinin yapısında meydana gelen her modifikasyondur [4]. Örneğin neredeyse her ökaryotik proteinin geçirdiği bilinen bir proteolitik modifikasyon vardır. Post-translasyonel modifikasyonlar peptit zincirine kovalent bağlı bir grubun ayrılması veya bir kimyasal grubun kovalent olarak yapıya bağlanmasıyla olabilir. Alifatik aminoasitlerin yan zincirleri (örneğin; valin, alanin, glisin) ve fenilalanin post-translasyonel modifikasyona katılmaz. Fakat amin, tiyol, tiyoeter, karboksilik asit ve hidroksil gibi yan gruplar, biyolojik çevrede, kovalent modifikasyonlara duyarlıdır [4].

Post-translasyonel modifikasyonlar çeşitli enzimlerin katalizlemesiyle gerçekleşirler. Bu modifikasyonlardaki kovalent bağlanma veya ayrılmanın gerçekleşebilmesi için çeşitli kofaktörlere ihtiyaç duyulabilir. Bunlara asetilasyon için asetil koenzim A, fosforilasyon için adenozin trifosfat (ATP) ve glikolizasyon için UDP-glikoz örnekleri verilebilir [6]. Bu dönüşümlere ait reaksiyonlar Şekil 2.3' de verilmiştir.

Tüm bu modifikasyonlar bağlandıkları aminoasitin fiziksel özelliklerini değiştirmektedirler. Bunlar negatif yüklü bir fosfat grubunun yapıya dahil olması veya zincirin azot içeren fonksiyonel grubunun bulunduğu ucunda yer alan amin grubunun asetillenerek amid grubuna dönüşmesi şeklinde gerçekleşebilirler. Bu değişiklikler, sadece ilgili aminoasiti değil protein yapısının bütününe etkiler [6].

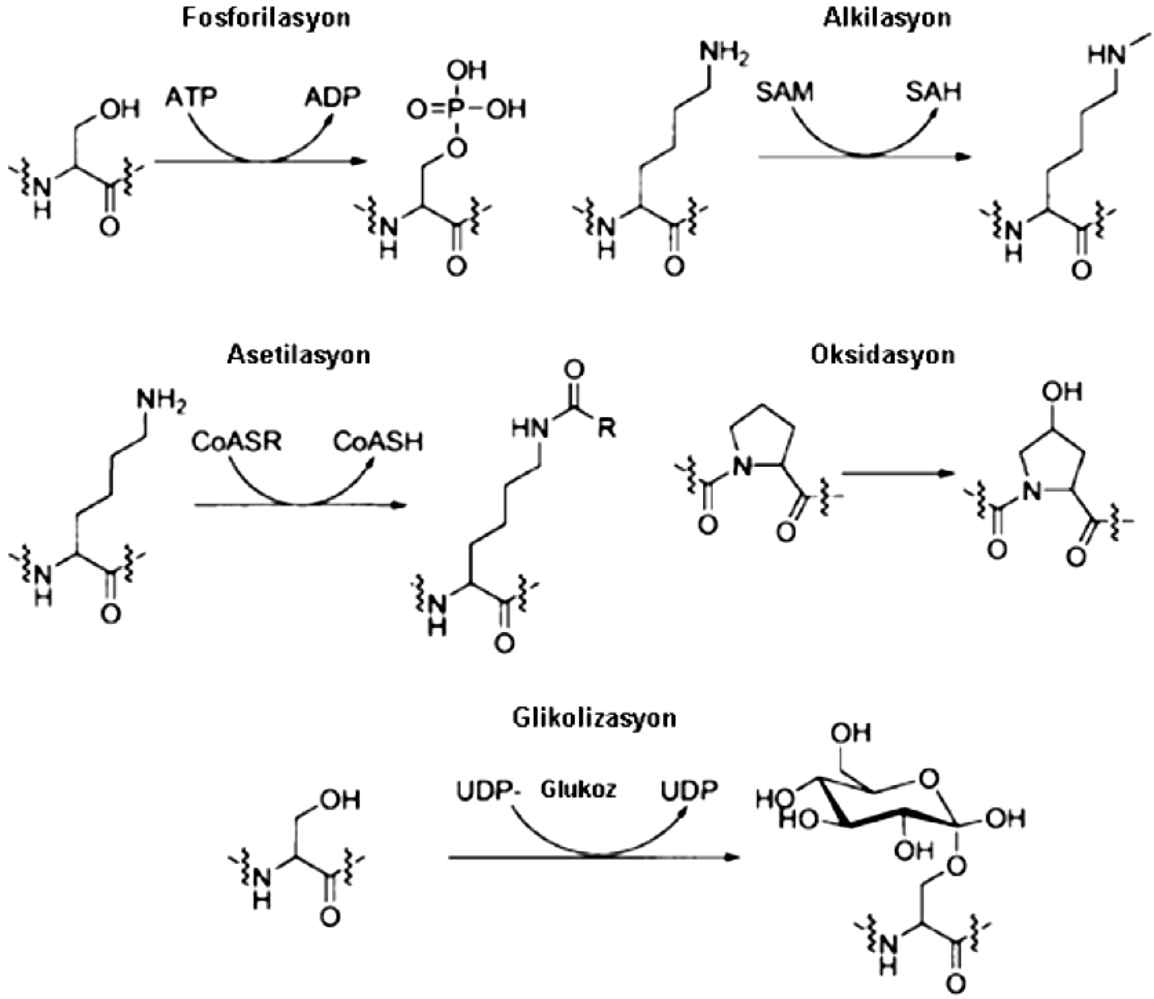
Tablo 2.1: Bazı temel modifikasyon türleri ve özellikleri.

Modifikasyon	Modifiye Olmuş Aminoasit	Modifiye Olan Parçanın Kütlesi (Da) (mono izotopik)	Kütle Değişimi (Da) (mono izotopik)
β -Eliminasyonu; Serin Treonin	Dehidroalenin Dehidroamino-2- bütirik Asit	69,02 83,04	-18,01 -18,01
Asetilasyon, Lizin N-terminal Biyotinilasyon; Lizin N-terminal	N-asetillizin	170,11	+42,01 +226,08
Borominasyon; Tirozin	Bromotirozin	240,97	+77,91
Karbamil karboksilasyon; Aspartik asit Glutamik asit	β -karboksiaspartik asit γ -karboksiglutamik asit	159,03 173,04	+44,00 +44,00
Klorinasyon; Tirozin	Klorotirozin	197,02	+33,96
Deamidasyon; Asparjin Glutamin			-0,984 -0,984
Disülfit bağı oluşumu Formilasyon	N-terminal		-2,02 +27,99

Tablo 1 devam ediyor			
Glutasyonilasyon; Sistein	S-glutasyonilsistein	408,08	+305,07
Hidroksilasyon; Prolin	γ -Hidroksiprolin	113,05	+16,0
Asparjin	β -Hidroksiasparjin	130,04	+16,0
Aspartik asit	β -Hidroksiaspartik asit	131,03	+16,0
Lizin	δ -Hidroksilizin	144,10	+16,0
Karbamil lizin		171,11	+43
Metilasyon; Aspartik asit	Aspartik asit metil ester	129,05	+14,02
Glutamik asit	Glutamik asit metil ester	143,06	+14,02
Nitrolama; Tirozin	Nitritirozin	208,01	+45,1
Oksidasyon; Metiyonin	Metiyonin sülfoksit	147,04	+16,00
Sistein	Sisteik asit	151,01	+48,00
Fosforilasyon; Serin	Fosfoserin	167,00	+79,97
Trionin	Fosfotirozin	181,00	+79,97
Aspartik asit	Fosfoaspartik asit	195,00	+79,97
Lizin	Fosfolizin	208,07	+79,97
Histidin	Fosfohistidin	217,03	+79,97
Tirozin	Fosfotirozin	243,03	+79,97
Sülfatlama; Tirozin	Sülfotirozin	243,07	+79,97

Post-translasyonel modifikasyonlar sonucu protein yapısında meydana gelen değişimleri incelemek, incelenen proteinin aktivitesini veya sinyal iletim mekanizmasındaki rolünü aydınlatmada yardımcı olabilir.

Şekil 2.2.'de en sık rastlanılan post-translasyonel modifikasyonların mekanizmaları görölmektedir.



Şekil 2.2. En sık rastlanılan post-translasyonel modifikasyonlar [8].

Fakat post-translasyonel modifikasyonların hücrel gelişim, aktivite ve tepki verme mekanizmalarındaki rolleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konuda yapılan araştırma sayısının gün geçtikçe artmasına karşın, post-translasyonel modifikasyon geçiren

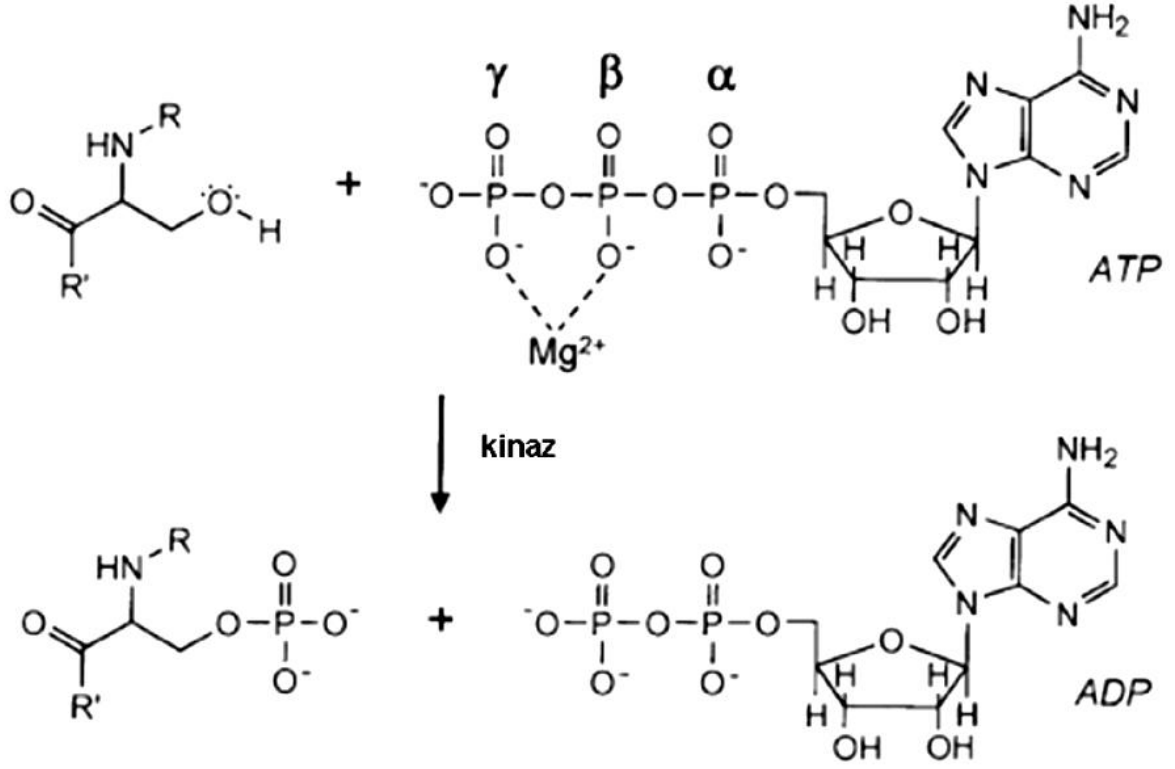
proteinin bulunduğu ortamdan ayrılıp analiz edilmesi konusunda yaşanan birçok zorluk vardır.

2.2.1. Fosforilasyona Bağlı Post-translasyonel Modifikasyon

Fosforilasyon, bilinen post-translasyonel modifikasyonlar içinde en sık rastlanılan ve üzerine en çok çalışma yapılanıdır. Hücrel proteinlerin % 30'una yakını farklı zamanlar ve fonksiyonlar dahilinde fosfatlanmış durumda bulunmaktadır [9-10].

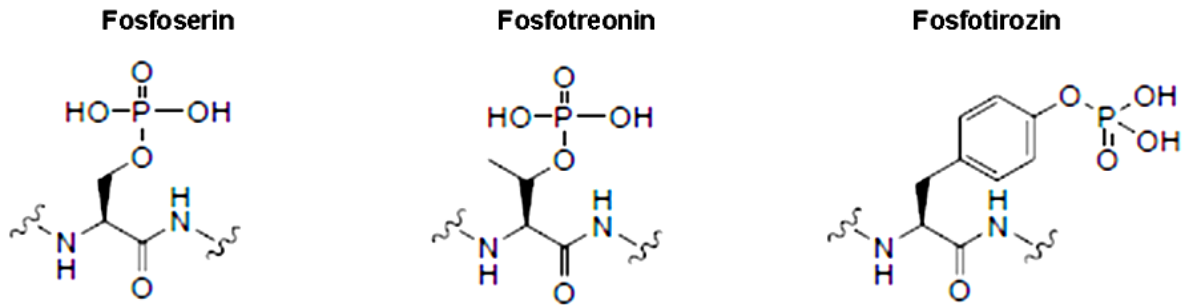
1906 yılında bir proteindeki fosfat grubu ilk defa Phoebus Levene tarafından vitellin proteininde bulunmuştur. 1933 yılında ise Phoebus Levene ile Fritz Lipmann ilk defa, kazeide fosfoserin aminoasitini bulmuşlardır. Buna rağmen Eugene P. Kennedy tarafından “proteinlerin enzimatik parçalanması”nın tanımlanması 20 yıl sürmüştür. Daha sonra biyolojik bir düzenleyici mekanizma olarak tersinir protein fosforilasyonunun önemi, ilk olarak, 1992 yılında Edmond H. Fischer ve Edwin G. Krebs'in iki değerli metal iyonu varlığında tersinir fosforilasyon ile glikojen fosforilazın (fosforilaz b) inaktif formunu aktif forma (fosforilaz a) dönüştürdükleri çalışmalarıyla Nobel ödülünü kazandıkları zaman anlaşılmıştır [11].

Ökaryotik canlılarda fosforilasyon sürecinde serin, trionin ve tirozin aminoasitlerinin yan zincirlerindeki hidroksit grupları, fosfat grubu transferine katılır. Ancak aminoasitlerin peptit zincirlerinin dizilimi fosfatlanmaya yatkınlıklarına etki eder. Adenozin trifosfat (ATP), kinaz enzimi varlığında fosfat grubunun kaynağı olarak görev almaktadır. Bu olayda, ATP, gama fosfat grubunu kaybeder ve adenozin difosfata (ADP) dönüşür (Şekil 2.3.) [12]. Bir fosfat grubunun protein yapısına dahil olmasıyla proteinin molekül ağırlığı 80 Da kadar artarken (fosfat grubu tamamıyla protone ise $H_2PO_4^-$) ortamın pH'sı yüksek değerlere çıktığında protein molekül ağırlığı sadece 78 Da kadar artmaktadır (fosfat grubu tamamıyla deprotone ise/ PO_4^{-3}).



Şekil 2.3. ATP varlığında kinaz enzimi katalizi ile serin aminoasidinin fosforilasyonu [12].

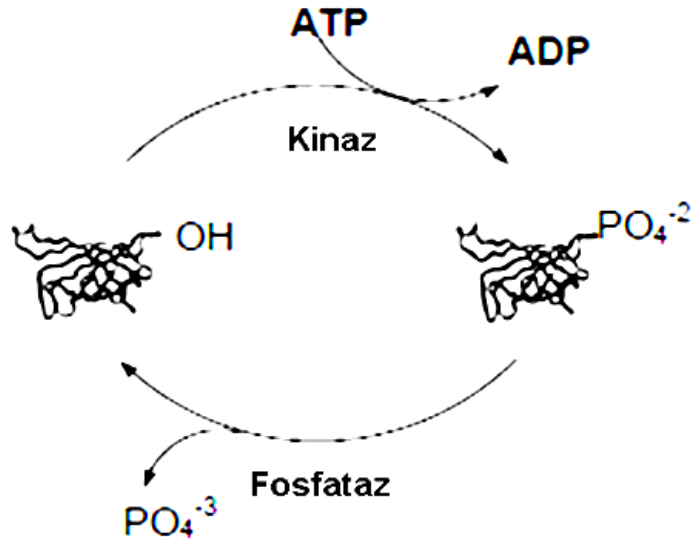
Ökaryotik hücrelerde fosforilasyon genellikle serin, treonin, tirozin ve histidin aminoasitlerinde olur. Memeli hücrelerinde fosfatlanan aminoasitlerin % 99,9'u serin ve treonin; geriye kalan çok küçük bir kısmı ise, tirozin [13] aminoasitleridir. Fosfatlanan bu aminoasitlerin yapıları Şekil 2.4.'te verilmiştir. Prokaryotik hücrelerde ise histidin, metiyonin ve aspartik asit fosfatlanmış halde bulunur.



Şekil 2.4. Fosfatlanmış serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin kimyasal yapıları.

Fosforilasyon bir veya daha çok fosfat grubunun bir proteine tersinir ve kovalent olarak bağlanmasıdır. Birçok enzimin ve reseptörün yapısında fosforilasyon ve defosforilasyon yolu ile konformasyonel bir değişim gerçekleşir böylece enzim ve reseptör aktif veya inaktif hale geçer. Proteinde fosforilasyon sonucu oluşan bu konformasyonel değişimin sebebi, aminoasit kalıntısının bir polar R grubuna eklenen fosfatın (PO_4), aminoasit kalıntısının hidrofobik bir kısmını, fazlaca hidrofilik hale getirmesi ile proteinin diğer aminoasit kalıntılarıyla kendi içinde hidrofobik-hidrofilik etkileşimler olması dolayısıyla yapısında bir yeniden düzenlenme olmasıdır. Bu yeniden düzenlenme sonucu reseptörlerin ve enzimlerin aktif veya inaktif hale geçme mekanizmalarının incelenmesi sinyal iletim mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlayacağından önemlidir. Örneğin, retinada bulunan ışığa duyarlı hücrelerde gerçekleşen bu gibi sinyal iletimleri ile gelen ışığın değerlendirilmesi işlemleri sağlanır [14].

Fosforilasyon işlemini katalizleyen özgün protein yapılarının adı kinaz; defosforilasyon olayını katalizleyen özgün protein yapılarının adı ise fosfatazdır. Bu enzimler ile katalizledikleri fosforilasyon ve defosforilasyon işlemlerinin şematik gösterimi Şekil 2.5.'de verilmiştir.



Şekil 2.5. Sinyal iletim ağı ve fosforilasyon-defosforilasyon ilişkisi.

İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin % 20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır [15]. Bu proteinler arasında hücre membranına yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer alır.

Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu gerçekleştirerek proteini aktive eder ve sinyal iletimini sağlar. Bu işlevsel mekanizma şematik olarak Şekil 2.6' da verilmiştir. Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılır.



Şekil 2.6. Sinyal iletim basamaklarının şematik gösterimi [16].

Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar denilmektedir. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri reseptörleri ve efrin reseptörleri yer almaktadır. Reseptör tirozin kinazlar sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu bir bölge olan tirozin kinaz bölgesini bulundurlar. İstirahat halindeki bir hücrede, reseptör tirozin kinazın inaktif ve aktif (fosfatlanmış ve fosfatlanmamış) konformasyonları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçer ve sitoplazmadaki hedef proteinler ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. Reseptör tirozin kinazların aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. İkinci aşamada ise, bu fosfatlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanarak uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Reseptör tirozin kinazların aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz enzimi sorumludur. Fosfatazlar, kinazlara karşı çalışarak kinazların işlevlerini dengelerler. Bu nedenle fosfatazlar da kinazlar gibi genelde serin/treonin fosfatazlar ve tirozin fosfatazlar diye sınıflandırılmaktadır.

Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve reseptör tirozin kinaz aracılı iletim kontrol altında tutulur. Dolayısıyla reseptör tirozin kinazlar, gen mutasyonu veya kromozom translokasyonu nedeniyle değişime uğrarsa kanser, Alzheimer gibi hastalıkların gelişimi söz konusu olur. Bu nedenle sinyal iletim mekanizmalarını incelemek önemlidir.

2.3. Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

2.3.1. Protein Saflaştırması

Bir proteinin yapısı veya mekanizması çalışılmadan önce protein mutlaka saflaştırılmalıdır. Proteinlerin büyüklüğü, yükü, suda çözünübilirlikleri farklıdır bu yüzden tek bir metodla tüm proteinleri izole etmek mümkün değildir. Bir canlı hücresinin ekstrakte edilip biyolojik aktivite kaybı olmaksızın, protein izalasyonu yapılması işlemine protein saflaştırması adı verilir. Bu işlem için öncelikle uygun doku seçilmelidir. Eğer hedeflenen protein önceden belli ise, bu proteini en yüksek miktarda içeren, kompleksitesi düşük, kaynak belirlenmelidir. Sonraki adım ekstraksiyon adıdır. Bu adımda hücre mekanik (sonikasyon, homojenizasyon, Fransız presisi), fiziksel (osmotik şok, dondurma/çözdürme) veya kimyasal (organik çözücüler, deterjanlar, lizozim, glukanaaz) tekniklerle parçalanır. Bu aşamada homojenizasyonun başarısı, genellikle tampon seçimi, proteaz inhibitörlerinin kullanımı ve çözeltiye alma tamponunun ozmolaritesi gibi faktörlere bağlıdır. Proteoliz

ekstraksiyondan sonra ve saflaştırma işleminin tümünde önemli bir problemdir ve bu problemi aşmak amacıyla proteaz inhibitörleri kullanılır.

Dokudan ham ekstrakte edilen proteinler çöktürülmelidir. Bu amaçla amonyum sülfat gibi tuzlar veya soğuk etanol, aseton gibi organik çözücüler kullanılır. Eğer amonyum sülfat benzeri tuzlar kullanılmışsa bu tuzların uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla diyaliz, ultrafiltrasyon veya jel geçirgenlik kromatografisi kullanılabilir. Eğer organik çözücü ile çöktürme gerçekleştirildiyse bu çözücünün de ortamdan uzaklaştırılması gerekir.

Saflaştırma işlemi proteinlerin, büyüklüğü, kütlesi, şekli, çözünürlüğü, polaritesi, afinitesi gibi özellikleri kullanılarak yapılabilir.

Büyüklik ve kütesine göre saflaştırma işlemi yapılan yöntemler; santrifüj, filtrasyon, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi, jel elektroforezidir (SDS-PAGE).

Santrifüj yönteminde sulu karışımlara yüksek hızlı dönme kuvveti uygulanır. Bu kuvvet sayesinde sulu karışımdaki daha büyük ve yoğun bileşenler daha hızlı çökerler. Kütle büyüdükçe çökmesini sağlayan santrifüj gücü azalır.

2.3.2. Protein Karakterizasyonu

İlk kez inüsilin proteininin dizilimini kimyasal bir yöntem kullanarak bulan Frederick Sanger, 1958 yılında bu çalışmasıyla Nobel Ödülü'nü almıştır. O zamandan beri protein karakterizasyonu yoğun çalışılan konular arasına girmiştir. Günden güne artan yeni tekniklerin sayısı da protein dizilimlerinin daha doğru ve hızlı yapılmasına yardımcı olmuştur. Bu amaçla kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır.

2.4. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisi 1995 yılından bu tarafa yoğun olarak protein dizilim tayinlerinde kullanılmaktadır [17]. Fakat kütle spektrometrisinin tarihi çok öncelere dayanmaktadır, ilk defa 1906 yılında elektronların varlığını kanıtlayarak Nobel ödülünü kazanan J J Thomson 1913 yılında Neon'un ^{20}Ne ve ^{22}Ne olmak üzere iki izotopunun olduğunu göstererek kütle spektrometresinde ilk adımı atmıştır [18]. Kütle spektrometrisi ise ilk kez Sir Joseph J. Thomson [19] tarafından ortaya atılmıştır. Kütle spektrometresinin ticari amaçla kullanımı 1940'lı yıllarda başlamış, petrol ve kimya endüstrisinde kullanıma sunulmuştur. Holmes ve Morrell isimli araştırmacılar 1957 yılında ilk defa gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) kombinasyonunu oluşturmuşlardır [20]. GC-MS in biyokimyada kullanımı 1956 yılında steroidlerin analizi ile başlamış, 1960'lı yıllarda GC-MS ile peptit ve nükleotidlerin

dizilim analizleri gerçekleştirilmiştir. 1980'li yıllarda tandem kütle spektrometresi geliştirilmiş ve birçok alanda kullanıma sunulmuştur. Artık günümüzde yapılacak analizin özelliğine göre değişen tiplerde son derece hassas kütle spektrometreleri geliştirilmiş, tıp, kimya ve fizik gibi bilim dalı laboratuvarlarının önemli cihazları haline gelmiştir.

Kütle spektrometrisi, ayrı ayrı bileşiklerin ve atomların moleküler kütlelerini yüklü iyonlara çevirerek ölçen analitik bir tekniktir. Çoğunlukla bir molekülün yapısı da bu şekilde belirlenebilir. Kütle spektrometresinde, analiz edilen türün vakum altında gaz fazında iyon haline dönüştürülmesiyle, kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılan bu iyonların tayin edilebilmesi için kütle ayırıcısı ile birleştirilmiş bir detektör kullanılmaktadır. İyonların bu detektör sayesinde oluşturdukları sinyaller kütle spektrumu olarak kaydedilir.

İlk zamanlarda genellikle kütle spektrometrelerinde elektron bombardımanlı (EI) iyonlaştırıcılar kullanılırken sadece uçucu örnekler analiz edilebilirdi. Uçucu olmayan veya ısısal kararlılığı düşük olan türlerin analiz edilebilmeye başlanması desorpsiyon/iyonlaştırmalı tekniklerin geliştirilmeleriyle mümkün kılınmıştır. Kütle spektrometrik desorpsiyon/iyonlaştırmalı yöntemler, alan desorpsiyon (Field Desorption, FD), lazer desorpsiyon (Laser Desorption, LD), matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI), ikincil iyon kütle spektrometrisi (Secondary-Ion Mass Spectrometry, SIMS) ve hızlı atom bombardıman (Fast Atom Bombardment, FAB) gibi yöntemleri kapsamaktadırlar. Alan ve lazer desorpsiyon yöntemlerinin kullanım alanları sınırlıdır. Alan desorpsiyon, örneğin yüksek elektriksel alanda ısıtılmasını gerektirir [21]. Lazer desorpsiyonunda ise örnek nanosaniyeler içinde çok yüksek sıcaklıklara ulaşır böylece kimyasal bozunma gerçekleşmeden desorpsiyon gerçekleşir. Böylece molekül parçalanmadan desorbe edilir, aynı anda bir kısmı iyonlaşır. Fakat bu yöntemin önemli bir sınırlaması molekül ağırlığı 1000 Dalton (Da)' dan büyük olan örnekler için uygun olmamasıdır. Dolayısıyla bu sınırlama büyük molekül ağırlıklarına sahip olan moleküllerin, bunlara örnek olarak biyomoleküllerin, analizlerini mümkün kılmamaktadır. Bu sınırlamanın aşılabildiği iki yöntem MALDI ve ESI teknikleridir. Bu yüzden, MALDI ve ESI tekniklerini özellikle yüksek molekül ağırlıklarına sahip maddelerin analizlerindeki başarıları nedeniyle farklı bir boyutta ele almak gerekmektedir [4]. Molekül ağırlığı sınırlamasını 100 kilodalton (kDa)' a kadar genişleten bu iki yöntem biyoloji ve yaşam bilimlerinde kütle spektrometrisinin kullanımında çok büyük bir etki yaratmıştır [22].

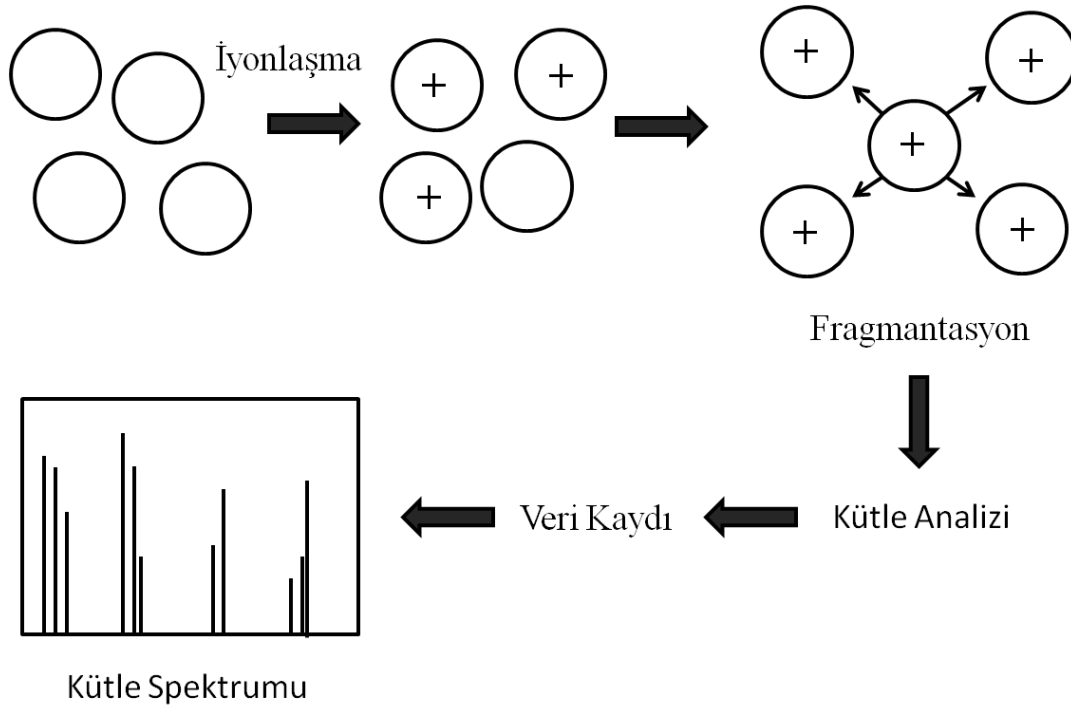
Bu gelişmelerle eş zamanlı olarak kütle analizör teknolojisinde birçok yenilik olmuştur. Bunlara, yüksek alanlı (high field) ve süper hızlı (super fast) mıknatısların ortaya çıkması, TOF ve Fourier Transform (FT) İyon Siklotron (Ion Cyclotron) Rezonans-Kütle Spektrometrisi (ICR-MS) analiz kavramlarındaki gelişmeler örnek verilebilir [23]. Son on yılda iki yeni tip iyon tuzağı (ion trap) ortaya çıkmıştır. Bunlar, Dörtkutuplu Lineer İyon Tuzağı (LIT) ve Orbitrap'dir [24]. Ayrıca kütle spektrometrisinin performansını artırmak amacıyla çeşitli hibrit tandem kütle spektrometrisi sistemleri kullanılmaktadır.

Kütle spektrometrisi birçok sebepten tercih edilir ve sıklıkla kullanılır. Tüm elementlere uygulanabilmesi, birçok bileşiğin yapısını tayin etmedeki benzersiz çok yönlülüğü, çok yüksek hassasiyeti ve gözlenebilme limiti olması (teoride kütle spektrometrisi bir atomu zeptomol veya attomol düzeyinde analiz edebilir), polar-apolar, katı-sıvı-gaz her tip örneğe uygulanabilmesi, yüksek ayırma gücünde cihazlarla kombine edilmesi bu sebeplerden birkaçıdır.

2.4.1. Kütle Spektrometrisi Çalışma Prensibi

Kütle spektrometrisinin analizi moleküler iyonlar üzerinden gerçekleşir. İyonların hareketini hızlandırmak veya hareket yönlerini değiştirmek kolaydır. Kütle spektrometrisinin analiz prensibi üç temel adıma dayanır. Bu adımların kısaca gösterimi Şekil 2.7.' de verilmiştir. Birinci adım analiz edilecek örneğin moleküllerini veya atomlarını gaz fazında iyonik türlere dönüştürmektir. Bu adım bir proton veya elektronun molekülden veya atomdan ayrılması veya eklenmesiyle gerçekleşir. İkinci adım ayırma adımındır. Fragmentlerine ayrılan iyonlar moleküler kütleleri-yük oranlarına göre (m/z) ayrılırlar. Son adımda ise kütle analizöründe ayrılan iyonlar, ölçülür ve ayrıntıları ile kütle spektrumuna dönüştürülür.

İlk iki adım yüksek vakum altında gerçekleştirilir. Bu sayede iyonlar birbirleri ile etkileşmeden veya çarpışmadan serbestçe hareket edebilirler. Çarpışma iyonu fragmentlerine ayrabilir veya sonucunda yeni türlerin oluşumuna sebep olabilir. Ayrıca atmosferik ortam analizde girişim yapabilir. Tüm bunlar hassasiyeti ve ayırma gücünü düşürür.



Şekil 2.7. Kütle spektrometrisi analiz basamakları.

2.4.2. Kütle Spektrometrisinde İyon Kaynakları

Kütle spektrometrisi ile hangi molekül analiz edilirse edilsin analizin en kritik ve zor basamağı iyonlaşma basamağıdır. Bir kütle spektrometrik analizin başarısı büyük ölçüde, nötral haldeki bileşiği gaz fazında iyon haline geçirmeye bağlıdır. Yıllar boyu birçok iyonlaştırma tekniği bulunmuş fakat hiçbiri evrensel olarak dikkat çekici boyutta başarıya sahip olmamıştır. Temel iyonlaştırma teknikleri Tablo 2.2' de verilmiştir.

Elektron bombardımanlı (EI) iyon kaynağı, en eski iyonlaştırma yöntemlerinden biridir. İlk kez Dempster [25] tarafından tasarlanmış ve daha sonra Nier [26] tarafından geliştirilmiştir. Moleküler kütlesi 600 Da' dan küçük olan organik bileşiklere uygun bir iyonlaştırma yöntemidir. Bu yöntemin çalışma prensibi yüksek sıcaklıkta bir flmandan elde edilen elektronların bir manyetik alanda hızlandırılıp hedef moleküle çarptırılarak, hedef moleküle ait karakteristik iyon parçaları oluşturmaya dayanır. Bir başka iyonlaştırma yöntemi olan alan iyonlaştırma yöntemi ise Beckey tarafından 1969 yılında ortaya atılmıştır. Bu yöntem ısısal kararlılığı düşük olan ve uçucu olmayan örneklerin iyonlaştırılması için uygundur. Bu sayede biyolojik molekküllerin kütle spektrometrisinde analizi için ilk adım atılmıştır. Bu yöntemde analizi yapılacak örnek güçlü bir elektrik

alana maruz bırakılır ve bu alanda iyonlaşır. Bir diğer yöntem ise kimyasal iyonlaştırma (CI) yöntemidir. Bu yöntemde iyon-molekül reaksiyonları sonucunda iyonlaştırma yapılmaktadır [27]. Foto iyonlaştırma küçük moleküllerin iyonlaştırılmasında kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemde örneğin üzerine bir foton demeti gönderilir ve örneğin iyonlaşması sağlanır. Gelişmiş iyonlaştırma tekniklerinden olan Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI), UV-absorblayıcı bir matriks içerisinde katı veya sıvı örneğin lazer ile parçalamadan iyonlaştırma temeline dayanan bir yumuşak iyonlaştırma yöntemidir. 1985 yılında F. Hillenkamp ve M. Karas tarafından geliştirilmiştir [28]. Yeni matriks moleküllerinin keşfedilmeleriyle bu yöntemin iyonlaştırma verimi arttırılmakta ve böylece büyük proteinlerin ($MW > 500,000$) moleküler iyonları parçalamadan (intact) tayin edilebilmektedir. Yumuşak iyonlaştırma tekniklerinden bir diğeri olan elektrosprey iyonlaştırma (ESI) yöntemi biyomoleküller üzerinde çok kullanılan bir yöntemdir. Elektrosprey yöntemi ilk defa Malcom Dole tarafından 1968 yılında ortaya atılmıştır. Bu yöntemde örnek bir elektrik alana püskürtülür ve burada yüklenmiş damlacıklar iyonlaşır.

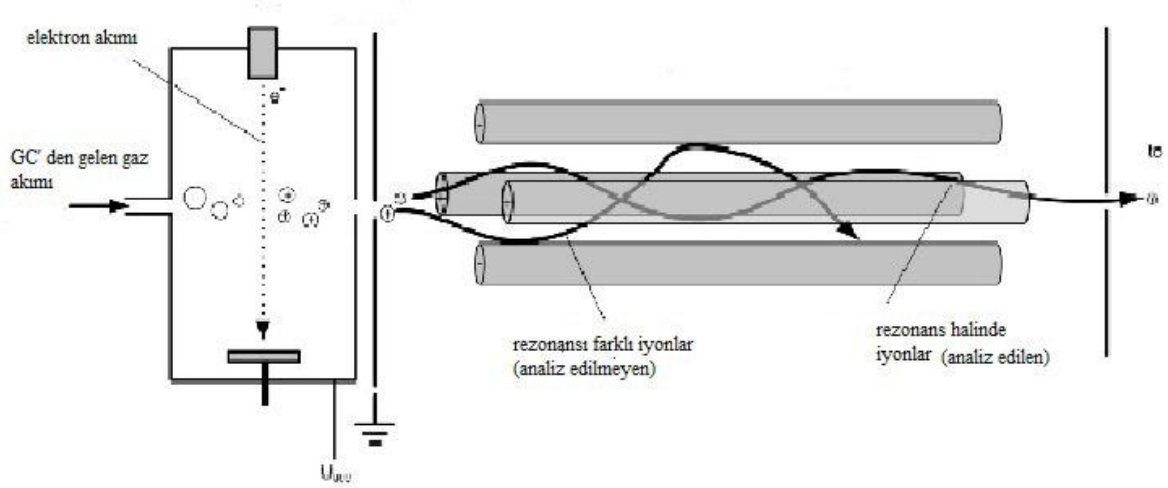
Tablo 2.2: İyonlaşma teknikleri.

Atomik İyonlaştırma	Moleküler İyonlaştırma	
Termal İyonlaştırma	Örneğin Fazı	İyonlaştırma Tipi
	Gaz Fazı	Elektron Bombardımanlı İyonlaştırma (EI)
		Kimyasal İyonlaştırma (CI)
Kıvılcım Kaynağı (Spark Source)		Foto İyonlaştırma (PI)
Yük Boşalması (Glow Discharge)		Alan İyonlaştırma
İndüktif Eşleşmiş Plazma (Inductively Coupled Plasma)		Yarı Kararlı Atom Bombardımanı
Rezonans İyonlaştırma	Çözelti Fazı	Termosprey
		Atmosferik Basınç CI
		Atmosferik Basınç PI
		Elektrosprey
	Katı Faz	Plazma Desorpsiyon
		Alan Desorpsiyonu
		İkincil-İyon MS
		Hızlı Atom Bombardımanı
		Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon

2.4.3. Kütle Ayırıcıları

Kütle ayırıcı, bir kütle spektrometrisinin kalbidir. Kütle spektrometrisinin performansı büyük ölçüde kütle ayırıcısına bağlıdır. Kütle spektrometresinde, örnek iyonlaştırıldıktan sonra bu iyonlar vakum altında birbirleriyle çarpışmadan veya etkileşmeden kütle/yük oranlarına göre ayrılırlar. Bu amaçla tasarlanmış çok çeşitli kütle ayırıcıları mevcuttur. İdeal bir kütle ayırıcısı, küçük kütle farklarını ayırt edebilmelidir. Manyetik ve elektrikli ayırıcılar sıklıkla kullanılan yüksek ayırma gücünde düşük maliyetli ayırıcılardır.

Dört kutuplu ve dört kutuplu iyon tuzağı (QIT) gibi kütle ayırıcıların geliştirilmesi, daha küçük ve ekonomik cihazların üretimlerini sağlamıştır. İlk ticari QIT kütle spektrometresi, 1953 yılında Wolfgang Paul [29] tarafından keşfedildikten yaklaşık 40 yıl sonra, 1984 yılında Finnigan tarafından kullanılmıştır [30]. Dört kutuplu kütle ayırıcıları, manyetik tiplere göre daha ucuz ve sağlamdır. Genellikle manyetik cihazlardan daha küçüktür ve masa üstü cihazlardır. Bu cihazların kısa tarama süreleri de ayrı bir avantajdır [31]. Dört kutuplu cihazın kalbi, elektrot olarak iş gören dört paralel silindirik çubuktur. Karşılıklı çubuklar elektriksel olarak birbirine bağlıdır. Her çubuk çiftine değişebilir radyo frekanslı alternatif akım uygulanır. Belli bir m/z değerine sahip örnek transdusere taşınır. Dört kutuplu kütle ayırıcısının şematik gösterimi Şekil 2.8.' de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Dört kutuplu kütle ayırıcısının şematik gösterimi. [32]

Uçuş zamanlı kütle ayırıcıları (TOF) 1946 yılındailk defa Stephens tarafından, bir tüp içerisinde iyonların vakum altında uçuş hızlarının farklılıklarına göre ayrıldıkları bir sistem

olarak tasarlanmıştır [33]. Uçuş zamanlı kütle ayırıcısı en basit kütle ayırıcılarından biridir. Uçuş zamanlı (TOF) cihazlarda, numunenin kısa elektron pulsları, ikincil iyonlar veya lazerle üretilmiş fotonlarla bombardıman edilmesiyle, periyodik olarak pozitif iyonlar üretilir [4]. Bu üretilen iyonlar elektrik alanda hızlandırılır ve vakum altında bir tüpte birbirleriyle etkileşmeden sürüklenirler. İyonların kinetik enerjisi (KE);

$$KE = zeE \quad (2.1)$$

Eşitlik 2.1 ile verilir. Eşitlikteki z iyon üzerindeki yük sayısını, e elektron yükünü ve E elektriksel alanı göstermektedir. Bu eşitlik iyon kaynağından çıktığında tüm iyonların aynı kinetik enerjide olduklarını gösterir. Bir iyonun kinetik enerjisi ile kütlesi arasındaki bağıntı ise;

$$KE = \frac{1}{2} mv^2 \quad (2.2)$$

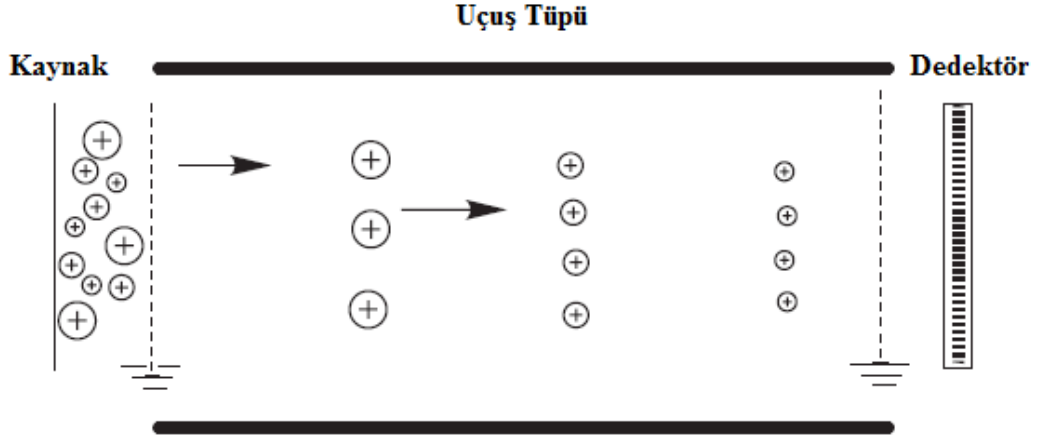
Eşitlik 2.2 ile verilir. Bu eşitlikteki V iyonun sahip olduğu son hızı gösterir. Bu eşitlik ile iyonların kinetik enerjileri eşit olduğunda, kütleleriyle ters orantılı hızlara sahip olacakları, momentum korunum ilkesinden dolayı, anlaşılmaktadır. Verilen iki eşitliğin birleştirilmesinden, bir iyonun tüp içerisinden geçip dedektöre ulaşması için gereken zaman bulunabilir.

$$t = \left(\frac{m}{2zeE} \right)^{\frac{1}{2}} D, \quad (2.3)$$

Eşitlik 2.3' de D tüpün uzunluğudur. Bu eşitlik yeniden düzenlenerek bir iyonun tüp içerisindeki uçuş süresi ile kütle/yük oranı arasındaki ilişkiye ulaşılabilir.

$$\frac{m}{z} = 2eE \left(\frac{t}{D} \right)^2 \quad (2.4)$$

İyonların tüp içindeki hızları kütleleriyle ters orantılıdır. Uçuş zamanlı ayırıcılar diğer tiplere göre basitlik, sağlamlık, iyon kaynağının kolayca değiştirilebilmesi ve sınırsız kütle aralığı gibi birçok bakımdan daha üstündür. Uçuş zamanlı bir kütle ayırıcısının çalışma prensibi Şekil 2.9.' da verilmiştir.



Şekil 2.9. Uçuş zamanlı bir kütle ayırıcısının çalışma prensibinin şematik gösterimi [31].

Uçuş zamanlı kütle ayırıcısı, matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI) ile kombine edildiğinde biyomolekülleri analiz etmek için son derece verimli ve kullanışlı bir yöntemeye dönüşür.

2.4.4. En Çok Tercih Edilen Yeni Nesil Kütle Spektrometreleri

Yumuşak iyonlaştırma tekniklerinin bulunmasından önce biyomoleküller gibi makro moleküllerin analizi yapılamamaktaydı. Yumuşak iyonlaştırma tekniklerinden olan MALDI-MS ve ESI-MS yöntemleri kütle spektrometrisinin biyomoleküller üzerinde kullanılabilmesini sağlamıştır. Bu yöntemler makro molekülleri parçalamadan moleküler iyonlar haline getirerek analizini mümkün kılar.

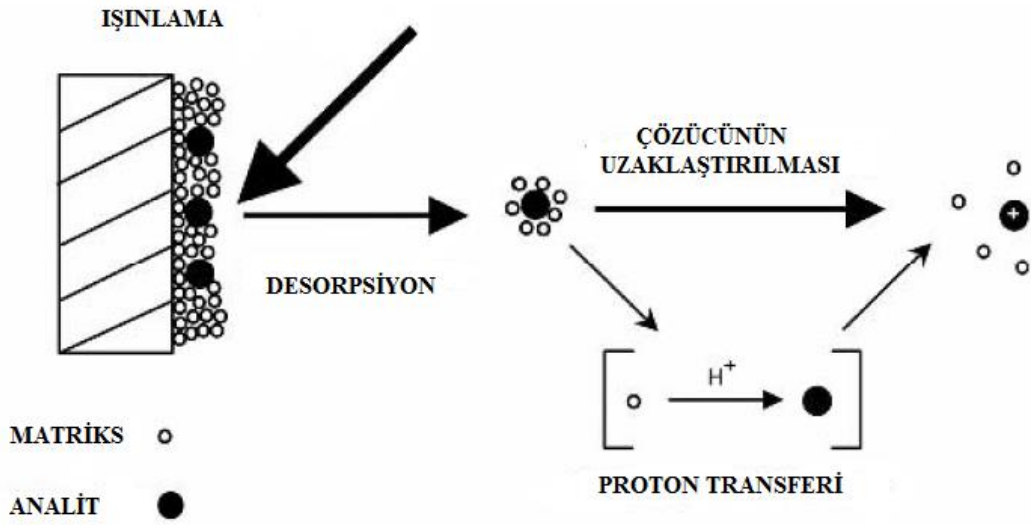
2.4.4.1. Matriks Yardımlı-Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma-Kütle Spektrometresi (MALDI-MS)

MALDI ilk defa Karas ve Hillenkamp tarafından alanin aminoasidinin moleküler iyonunun oluşumuna triptofan aminoasidinin katkısını göstermek amacı ile 1985 yılında kullanılmıştır [28].

MALDI-MS analizi iki aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada örnek matriks adı verilen küçük organik molekülü bir çözücüde çözülür [17]. Matriks, kullanılan lazer dalga boyunda yüksek absorpsiyona sahip olmalıdır. Analizi yapılacak örnek veya örnekler matriks içinde çözüldükten sonra bu karışım MALDI-MS örnek plakasına uygulanır ve kuruması beklenir. Kuruma sırasında kristallenme gözlenir. MALDI plakaları paslanmaz çelik veya altından olabilir. Bu plakalar üzerinde birden çok örnek aynı anda uygulanabilir ve analizleri aynı plaka üzerinden yapılabilir.

MALDI-MS analizinin ikinci aşaması vakum altında kütle spektrometrisinin içindeki kaynaktan gerçekleşir [17]. Plaka üzerinde matriksle karıştırılıp kristallendirilmiş analit moleküllerine kısa süreli lazer pulsları uygulanır. Matriks lazerin fazla enerjisini absorblarken analit molekülleri parçalanmadan iyonlaşırlar. Kütle analizöründen m/z oranlarına göre ayrılıp dedektörde analiz edilirler. MALDI'nin çalışma prensibi Şekil 2.10' da verilmiştir.

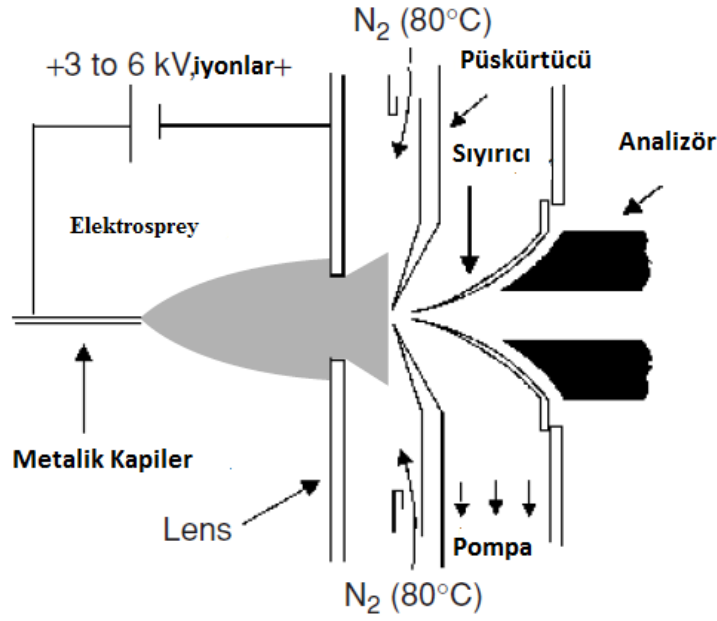
MALDI diğer iyonlaştırma tekniklerine göre daha hassastır. Matriks analitin tipine göre seçilir. Böylece lazer plakaya çarptığında analit molekülündeki zararı minimuma indirir. Böylece hassasiyet artmış olur. Lazer dalga boyunu analite göre ayarlamaya gerek yoktur çünkü matriks lazeri absorblar. Dolayısıyla MALDI diğer lazer iyonlaştırmalı tekniklerden daha çok kullanılır. MALDI ile 100.000 Da'a kadar kütlede moleküller analiz edilebilir. Sentetik polimerlerin ve biyopolimerin analizinde sıklıkla kullanılan etkin bir yöntemdir.



Şekil 2.10. MALDI çalışma prensibinin şematik gösterimi [17].

2.4.4.2. Elektrosprey İyonlaştırma-Kütle Spektrometresi (ESI-MS)

Elektrosprey uçucu olmayan türlerin iyonlaştırılmasında kullanılan bir başka yumuşak iyonlaştırma yöntemidir. Bu yöntemde iyonlar birden fazla pozitif yüke sahip olabilirler. Sıvı halde bulunan örnek, cihaz içerisine enjekte edilir ve akış hızı yaklaşık 1-10 $\mu\text{L}/\text{dak}$. olacak şekilde bir iğne boyunca pompalanır [34]. Enjekte edilen çözelti, içerisindeki analit moleküllerinde yük oluşturmak amacıyla, ucuna elektriksel potansiyel (3-5 kV) uygulanan iğne şeklindeki bir kapilerin ucundan püskürtülür (spraying) [35]. Bu püskürtme ile çok küçük damlacıklar halinde bir çözelti bulutu oluşur. Bu çözelti bulutunun üzerine kurutucu gaz gönderilir. Böylece analit moleküllerinin etrafındaki çözücü molekülleri hızla buharlaşır ve analit çözücünden büyük ölçüde arınmış olur. Çözücünün buharlaştırılması sonucunda, giderek küçülen çözelti damlacıklarında yer alan analit molekülleri, sahip oldukları yükler nedeniyle birbirlerini iterek kulombik patlamalara (Coulombic explosions due to charge repulsion) sebep olur ve bu patlamalar sonucu aynı tür moleküllerin farklı yüklere sahip iyonları oluşur [34]. Şekil 2.11.'de elektrosprey çalışma prensibi görülmektedir. İyonlaşan ve çözücünden arınan analit kütle ayrıcısında ayrılır ve dedektöre gelerek analizi tamamlanır.



Şekil 2.11. Elektrosprey çalışma prensibinin şematik gösterimi [17].

2.5. Fosfoproteomiks

Fosfoproteomiks, proteomiksin bir alt dalı olarak fosfat grubu içeren proteinleri tanımlar ve karakterize eder. Fosfoproteomiks, fosfoproteinlerin miktarı proteinlere göre az olduğundan, buldukları ortam çok karmaşık olduğundan, protein yapıları farklı bölgelerden fosfatlanabilir olduğundan zordur. Fosfoproteinlerin öncelikle buldukları ortamdan ayrılıp zenginleştirilmeleri gerekir. Fosfoproteinlerin miktarları diğer proteinlere göre az ve iyonlaşma verimleri düşük olduğundan analiz edilmeden önce zenginleştirilmeleri gerekir.

Fosfopeptitlerin zenginleştirilmesinde kovalent bağlanmaya veya kovalent olmayan etkileşimlere dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan İmmobilize edilmiş metal afinite kromatografisinde (IMAC) fosfopeptitler, şelat yapısındaki metal iyonlarına (Fe^{3+} , Ga^{3+}) metal-fosfat iyonu çifti etkileşimleri aracılığıyla tutunurlar. Bir diğer yöntem olan metal oksit afinite kromatografisi (MOAC), (ör; TiO_2 , ZrO_2) yöntemi de fosfopeptitlerin fosfat grupları üzerinden iki dişli (bidentate) etkileşimlerle yüzeye tutunmaları için kullanılmaktadır. Ayrıca iyon değiştirici reçineler yük ayırımına dayanarak fosfopeptitlerin kısmi zenginleştirilmelerine olanak sağlarlar. Bunların yanında, yüksek

seçicilikteki antikorların kullanılması, fosfopeptitlerin, fosfoproteinler gibi seçimli immün saflaştırılmalarını sağlar.

2.5.1. Kütle Spektrometrisinin Fosfoproteomikte Kullanılması

Kütle spektrometrisi fosfoproteomikte, fosfatlanmış peptitleri tanımlamakta, fosfopeptitlerin aminoasit dizilimlerini belirlemekte, yapının nerden fosfatlandığını tespit etmekte, biyolojik şartların farklılığında fosfatlanma bölgelerinin yer ve sayısını tespit etmekte kullanılır.

Fosfopeptitler yumuşak kırılğan makromoleküller olduklarından, yumuşak iyonlaştırmalı kütle spektrometreleri ve tandem kütle spektrometreleri kullanılarak analiz edilirler. Tandem kütle spektrometreleri arka arkaya eklenmiş kütle spektrometreleridir ve MS^n ile ifade edilirler. Buradaki n ardarda eklenmiş kütle spektrometresi sayısını gösterir. Böylelikle ayırıcılık ve hassasiyet katlanarak artar. Fosfoproteinden elde edilen bir kütle tekrar analiz edilip alt birimleri analiz edilebilir. Böylece fosfatlanma bölgeleri ve aminoasit dizilimleri bulunabilir.

Fosfopeptitlerin kütle spektrometrik analizinde en önemli problem iyonlaşma verimlerinin düşük olmasıdır. Bu yüzden hassasiyeti yüksek yumuşak iyonlaştırmalı kütle spektrometreleri kullanılmalıdır. MALDI-MS ve ESI-MS fosfoproteomiks için uygundur. fosfopeptitlerin MALDI yöntemiyle iyonlaştırılma verimlerinin diğer peptitlere kıyasla daha düşük olduğu ileri sürülmektedir [36]. Fosfopeptit analizlerindeki bu dezavantajı ortadan kaldırıp fosfopeptit iyonlaşma verimini arttırabilmek amacıyla 2,4,6-trihidroksiasetofenon gibi alternatif MALDI matrislerinin veya amonyum tuzları, fosforik asit gibi matris katkılarının kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır [37] [38]. Bu dezavantaj ile ESI yönteminde karşılaşılmamaktadır. ESI yönteminde, özellikle örnek içerisinde bulunan fosfopeptit miktarının diğer türlerden az olması sonucunda sinyal düşüklüğü gözlenmekle birlikte iyonlaştırma verimi ayırma işlemleri yapıldığından dolayı diğer peptit türlerinin baskılayıcı etkisi bulunmayacağından dolayı fazla etkilenmemektedir [39]. Bu problemlerin aşılması için fosfopeptitlerin kütle spektrometrik analizlerden önce zenginleştirilmeleri gerekmektedir. Zenginleştirilen fosfopeptitlerin derişimleri arttığı için iyon verimleri de artar.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Deneyleer kapsamında fosfopeptit kaynağı olarak sığıır sütünden elde edilen kazein protein kullanılmıştır. Bu proteinin alt birimi olan β -kazein Sigma (Seinheim, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Bu proteinin haricinde deneyleerde kullanılan Sığıır Serum Albümin (BSA) proteini, Qbiogene (Amerika); enzimatik parçalamada kullanılan Tripsin (sığıır pankreasından, E.C. 3.4.21.4, 14,100 U/mg) enzimi Sigma (Steinheim, Almanya) firmalarından temin edilmişlerdir. Enzimatik parçalama sırasında ortamın pH'sını uygun değerlere ayarlamak için kullanılan amonyum bikarbonat tuzu Sigma (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneyleerde kullanılan asetonitril, Merck (Darmstadt, Almanya), trifloroasetik asit ve etanol Riedel-de Haen (Almanya) firmalarından temin edilmişlerdir.

Deneyleerde kullanılan tüm metal oksitler Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır. MALDI kütle spektrometresi analizleri için örnek hazırlama işlemlerinde kullanılan 2,5-dihidroksi benzoik asit (DHB) MALDI matrigisi ve ortofosforik asit (% 85, w/v) çözeltilisi Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından alınmışlardır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

3.2.1. pH Metre

Deneyleerde gerekli olan tüm pH ayarlamaları Mettler Toledo-Seven Multi pH metre (Mettler Toledo, İsviç) ile yapılmıştır.

3.2.2. Deiyonize Su Sistemi

Tüm deneyleerde ve çözeltilerde kullanılan deiyonize su, Puris-Expe-UP-eleUV-M deiyonize su sistemi (Puris, Güney Kore) kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.3. Vortex

Deneyleerde inkübasyon ve yıkamalar sırasında yapılan karıştırma işlemlerinde Heidolph-Reax Control vortex (Heidolph, Almanya) kullanılmıştır.

3.2.4. Santrifüj

Yıkama işlemleri sırasında gereken tüm santrifüj işlemleri, MPW Medical Instruments High Speed Brushless Centrifuge (MPW, Çin) ile yapılmıştır.

3.2.5. MALDI Kütle Spektrometrisi

Tüm kütle spektrumları, Voyager-DETM PRO MALDI-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (Applied Biosystems, Amerika) ile alınmıştır. Sistemde 337 nm dalga boyunda çalışan azot lazeri (Spectra Physics, USA) kullanılmış ve uygulanan lazer enerjisi gerekli oldukça değiştirilmiştir. Analizler süresince iyonların hızlandırılması için uygulanan potansiyel yaklaşık 20 kV, sistemdeki vakum ise 5×10^{-8} torr civarında tutulmuştur. Bu değerler yapılan analizler için en uygun değerler olarak seçilmiştir. Spektrumlar lineer moda alınmıştır. Kütle spektrumları yaklaşık 100 lazer vuruşu sonucu toplanarak elde edilmiş ve kütle hatalarını düzeltmek için anjiyotensin (1296.5 g/mol), insülin (5733.5 g/mol) ve bradikinin (1060.2 g/mol) ile kütle kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar bilgisayara kaydedilmiştir.

3.3. MALDI Kütle Spektrometrisi Örnek Hazırlama

Yapılan tüm çalışmalarda matriks olarak 2,5-dihidroksibenzoik asit (% 1,0 orto-fosforik asit içeren, 1:1 su-asetonitril karışımında, 20 mg/mL derişiminde) kullanılmıştır. Yüzeyinde fosfopeptit zenginleştirmesi yapılan metal oksitlerin içerisine 20 µL bu matriksten eklenmiş, iyice karıştırılarak çamur kıvamına getirilmiş ve MALDI örnek plakasındaki her bir spota örnekler ayrı ayrı 1,0 µL eklenmiş ve açık havada kuruması için beklenmiştir. Örnekler kururken matriks ile karışık halde kristallenmiş ve bu kristaller MALDI-Kütle Spektrometresi ile analiz edilmiştir.

3.4. Enzimatik Parçalama

Kazein proteininin alt birimlerinde fosfatlanmış peptitler bulunmaktadır. Deneyleerde kazein proteininin β alt birimi kullanılmıştır. Proteinin enzimatik parçalanmasında, enzimatik parçalanmalarda en çok kullanılan ve seçimli parçalanma sağlayan enzim olan tripsin enzimi kullanılmıştır. Tripsin enzimi proteinlerdeki amino asit dizilimlerinde yer alan arjinin ve lizin aminoasitlerinin bağlı olduğu diğer amino asitlerdeki peptit bağlarındaki karboksil uçlarından parçalayarak küçük peptit birimlerini oluşturmaktadır..

Deneyleerde kullanılan protein stok çözeltileri, 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde 1,0 mg/mL derişimde hazırlanmıştır. Bu protein stok çözeltisinin içerisine, 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde 1,0 mg/mL derişiminde hazırlanmış tripsinden

100 µL eklenmiş, iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda enzimatik parçalanma işlemini durdurmak amacıyla 5,0 µL TFA eklenmiştir. Bu stok çözelti +4⁰ C'de muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere bu çözeltden 128 µL alınıp 372 µL su içerisine eklenerek 10 pmol/µL derişiminde kullanılmıştır.

3.5. Fosfopeptit Zenginleştirilmesi

3.5.1. Fosfopeptit Zenginleştirilmesinde En Özgün Davranan Metal Oksitlerin Tespit Edilmesi

Fosfopeptitlere en seçici davranan metal oksitin bulunması amacıyla, Bakır (II) oksit, Molibden (VI) oksit, Çinko (II) oksit, Nikel (II) oksit, Zirkonyum (IV) oksit, Vanadyum (V) oksit, Demir (III) oksit, Gadolinyum (III) oksit, Tantal (V) oksit, Disprosyum (III) oksit, Talyum (III) oksit bileşikleri ile ön denemeler yapıldı.

Bu denemelerde metal oksitler 100 µL ACN/Su (50:50) çözeltisi ile 3 kere yıkanarak şartlandırıldı. Sonra her bir metal oksite 50 µL ACN/Su/TFA (49:49:2) çözeltisi ve 10,0 pmol/ µL fosfopeptit çözeltisinden 2,0 µL eklendi. Bu karışımlar 30 dakika vortex altında karıştırıldıktan sonra 1,0 mL ACN/Su (50:50) ile üç kere yıkandı ve metal oksitler 20 mg/mL DHB matriksi ile karıştırılıp MALDI-MS analizleri yapıldı.

Bu çalışma sonrasında fosfopeptitlere en seçici davranan metalin oksiti tespit edilmiş zenginleştirme koşullarının optimize edilmesi çalışmalarına geçilmiştir.

3.5.2. Demir (III) oksit Kullanılarak Fosfopeptit Zenginleştirme Çalışmaları

3.5.2.1.1. β-kazein Proteini Kullanılarak

Fosfopeptitlerin Demir (III) oksit yüzeyine adsorpsiyonu için uygun pH'nın tespit edilmesi amacıyla pH= 1,0' dan 4,0' a kadar pH taraması yapılmıştır. Uygun pH tespit edildikten sonra β-kazein içerisindeki fosfopeptitler Demir (III) oksit yüzeyine aynı işlem ile tutturulmuş ve MALDI-MS ile doğrudan Demir (III) oksit yüzeyinden analizi yapılmıştır. Daha sonra yüzeyden yapılan analizlerin başarısını karşılaştırmak amacıyla fosfopeptitler, zenginleştirme yüzeyi olan Demir (III) oksitden desorbe edilip MALDI-MS analizleri yapılmıştır. Desorpsiyon pH'sı, amonyak kullanılarak 11,0'a çekilmiş amonyum bikarbonat-amonyak tamponu ile yapılmıştır.

Demir oksitlerin partikül büyüklüğünün adsorpsiyon üzerine etkisi olup olmadığına bakılmak için iki farklı partikül büyüklüğünde (5 nanometre ve 50 mikrometre) Demir (III) oksit ile optimum pH'da zenginleştirme çalışması yapılmıştır.

3.5.3. β -kazein/Bovine Serum Albumin (BSA) Karışımı Kullanılarak

BSA denatüre edilerek enzimatik olarak parçalanmıştır. Bu işlem için öncelikle 1,0 mg BSA tartıldı. Üzerine 20 μ L, 8,0 M üre eklendi. Üre bu işlemde disülfid bağlarını kırarak denatürasyonu sağlamaktadır. Bu karışım üzerine 1 μ L ditiyotritol (DTT) eklendi ve bir saat 37 °C' de su banyosunda bekletildi. Daha sonra 20 μ L iyodoasetamin (IAA) eklendi ve karanlıkta 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda karışıma 4 μ L ditiyotritol (DTT) eklendi. Bu protein karışımına 60 μ L amonyum bikarbonat (ABC) eklenerek seyreltildi. Başka bir eppendorfta 1 mg tripsin 100 μ L 25 mM amonyum bikarbonat (ABC) ile çözüldü ve bu karışımdan protein çözeltisinin içerisine 3,3 μ L eklendi. Bu karışım 37 °C'de bir gece bekletildi. Bu süre sonunda enzimatik parçalanma işlemini durdurmak amacıyla 1 μ L formik asit eklendi.

Demir (III) oksit kullanılarak en uygun adsorpsiyon koşulları belirlendikten sonra BSA'nın enzimatik parçalanması sonucu oluşan peptit birimleri ile β -kazein proteininin enzimatik parçalanması sonucu oluşan peptit birimlerinin oluşturduğu karışım içerisinden β -kazein proteininin fosfat grubu içeren peptitleri seçimli olarak ayrılıp Demir (III) oksit yüzeyinde zenginleştirilmiştir. Bu amaçla β -kazein proteininin enzimatik parçalanma ürünlerinin zenginleştirilmesinde kullanılan yöntem kullanılmış Demir (III) oksit yüzeyinde zenginleşen fosfopeptitler doğrudan Demir (III) oksit yüzeyinden MALDI-MS 20 mg/mL DHB matriksi kullanılarak analiz edilmiştir. Demir (III) oksit yüzeyinden direk yapılan analizler ile karşılaştırıp yöntemin başarısını gözlemleyebilmek amacı ile zenginleştirilen fosfopeptitler Demir (III) oksit yüzeyinden desorbe edilip MALDI-MS ile 20 mg/mL DHB matriksi kullanılarak analiz edilmiştir.

3.5.4. İnek Sütü Örneği Kullanılarak

İnek sütü denatüre edilerek enzimatik olarak parçalandı. Bu işlem için öncelikle 20 μ L yağsız inek sütü alınarak çalışıldı. Üzerine 20 μ L, 8,0 M üre eklendi. Üre bu işlemde disülfid bağlarını kırarak denatürasyonu sağlamaktadır. Bu karışım üzerine 1 μ L ditiyotritol (DTT) eklendi ve bir saat 37 °C' de su banyosunda bekletildi. Daha sonra 20 μ L iyodoasetamid (IAA) eklendi ve karanlıkta 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda karışıma 4 μ L ditiyotritol (DTT) eklendi. Bu protein karışımına 60 μ L BSA denatüre edilerek enzimatik olarak parçalandı. Bu işlem için öncelikle 1 mg BSA tartıldı. Bu karışım üzerine 1 μ L ditiyotritol (DTT) eklendi ve bir saat 37 °C' de su banyosunda bekletildi. Daha sonra alkilasyonun gerçekleşmesi amacıyla 20 μ L iyodoasetamid (IAA) eklendi ve

karanlıkta 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda karışıma 4 µL eklendi. Bu protein karışımına 60 µL amonyumbikarbonat (ABC) eklenerek seyreltildi. Başka bir eppendorfta 1 mg tripsin 100 µL 25 mM amonyum bikarbonat (ABC) ile çözüldü ve bu karışımdan protein çözeltisinin içerisine 3,3 µL eklendi. Bu karışım 37 °C'de bir gece bekletildi. Bu süre sonunda enzimatik parçalanma işlemini durdurmak amacıyla 1 µL formik asit eklendi.

Yöntemin, doğal bir örnek üzerindeki başarısını anlamak amacıyla inek sütünün enzimatik parçalanması sonucu oluşan peptitler içerisinde fosfatlanmış halde bulunan fosfopeptitler Demir (III) oksit yüzeyinde zenginleştirilmiştir.

Bu amaçla, tartılan 10 mg Demir (III) oksit üzerine inek sütünün enzimatik parçalanma ürünlerinden 50 µL ve ACN/Su/TFA (50:50:1) karışımından 70 µL eklenmiş 2 saat vortex ile karıştırarak etkileşime bırakılmıştır. Demir (III) oksit 3 defa ACN/Su/TFA (50:50:1) ile yıkanmıştır. Demir (III) oksit yüzeyine adsorbe olan fosfopeptitler 20 mg/mL DHB matriksi kullanılarak MALDI-MS ile analiz edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bir protein veya peptitteki amino asit dizisinde bulunan fosfatlanabilir amino asitlerin, fosfatlanma miktarları ve fosfatlanma yerlerinin analiz edilmesi hücrel çevrimler ve hücre döngüleri hakkında oldukça fazla bilgi vermektedir. Bu sayede hücrel döngüdeki bozukluklar tespit edilebilir ve neden oldukları hastalıkların ön tanısı koyulabilir. Bu yüzden fosfatlanmış amino asitlerin analizi çok önemlidir. Bu analizi kütle spektrometrik olarak gerçekleştirebilmek için peptitler parçalanmadan iyonlaştırılmalıdır. Bu ise ancak yumuşak iyonlaştırma sistemleri ile mümkün kılınabilir. Bu yöntemlerden en başarılı ve tercih edilenleri ise MALDI-MS ve ESI-MS'dir. Fakat fosfopeptitleri kütle spektrometrik yöntemler ile özgün olarak ayırıp zenginleştirmeden analiz etmek pek mümkün değildir. Bu yüzden özgün ayırma işlemi proteomik çalışmalarında büyük öneme sahiptir. Çünkü enzimatik parçalanma çözeltisinde fosfopeptitlerin bağıl bollukları diğer fosfatlanmamış türlere göre çok daha azdır ve fosfopeptitlerin kütle spektrometrik koşullarda kararlılıkları da oldukça zayıftır. Dolayısıyla fosfoproteomik analizden önce bu iki problem çözülmelidir. Bu çalışmada, bazı geçiş metallerinin oksitlerinin, fosfopeptitleri ayırma ve zenginleştirmedeki etkinlikleri denenmiştir. Bu çalışmada, Demir (III), Nikel (II), Zirkonyum (IV), Bakır (II), Talyum (III), Molibden (VI), Çinko (II), Vanadyum (V), Gadolinyum (III), Tantal (V), Dispersiyum (III) metallerinin oksitleri ile çalışmalar gerçekleştirilip etkinlikleri tespit edilmiştir. Bakır (II) ve Talyum (III) oksitlerinin çalışma koşulları için fazla çözünür olması nedeni ile çalışmalarda olumsuz sonuçlar verdiği ve kayıplara neden olduğu belirlenmiştir.

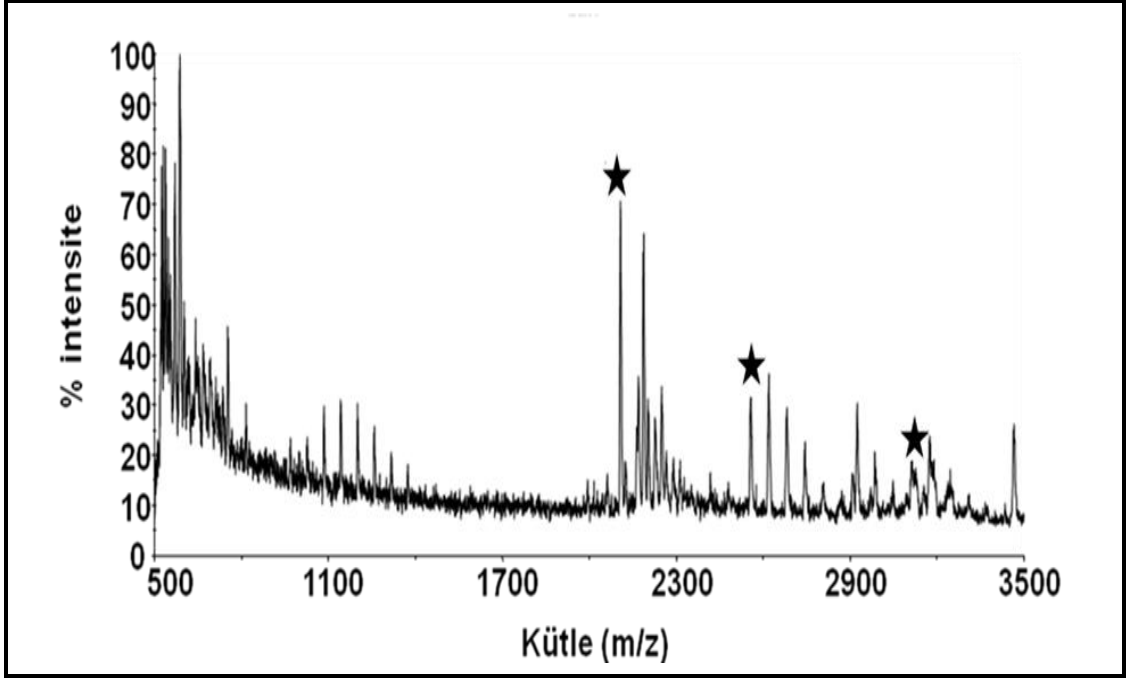
Bu çalışmada, metal oksitlerin zenginleştirme sonrasında desorpsiyon işlemleri basamakları elimine edilerek doğrudan metal oksit yüzeyinde özgün zenginleştirme işlemi yapıldıktan sonra analiz edilmeleri için bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem ile zenginleştirme sonrasında fosfopeptitler MALDI-MS ile doğrudan metal oksitlerin yüzeyinden analiz edilmiştir. Yöntemin başarısı, desorpsiyon basamakları uygulanıp fosfopeptitlerin zenginleştirme yüzeyi olan metal oksitlerin yüzeyinden ayrıldıktan sonra çözeltiden elde edilen kütle spektrometrik verilerle karşılaştırılmıştır.

4.1. Fosfopeptitlerin Zenginleştirilmesi için En Uygun Metal Oksitlerinin Belirlenmesi

Fosfopeptitler β -kazeinin tripsin enzimi ile parçalanması sonucu açığa çıkan peptit karışımından çeşitli metal oksit yüzeyleri kullanılarak zenginleştirilmiştir. Zenginleştirme sonrasında fosfopeptitler MALDI-MS ile doğrudan metal oksitlerin yüzeyinden analiz edilmiştir. Bu amaçla bakır oksit, nikel oksit, zirkonyum oksit, talyum oksit, demir oksit, disporisyum oksit, gadolinyum oksit, tantal oksit, molibden oksit, vanadyum oksit, çinko oksit bileşikleri ile denemeler yapılmıştır. Metal oksitlerin β -kazein içerisinde bulunan dört fosfopeptite (Tablo 4.1) ne kadar seçici davrandığı, ne kadar miktarda fosfopeptiti tutabildiği, oluşan metaloksit-fosfopeptit komplekslerinin kütle spektrometrik koşullarda ne kadar kararlı olduğu, daha sonra fosfopeptitlerin metal oksit yüzeyinden ne seçicilikle desorbe olduğu gibi özelliklerine bakılarak fosfopeptitleri metal oksit yüzeylerinden zenginleştirmek için uygun metal oksitler belirlenmeye çalışılmıştır.

Tablo 4.1: β -kazeinin tripsin enzimi ile seçimli parçalanması sonucu elde edilen fosfopeptitlerin monoizotopik kütleleri ve amino asit dizilimleri.

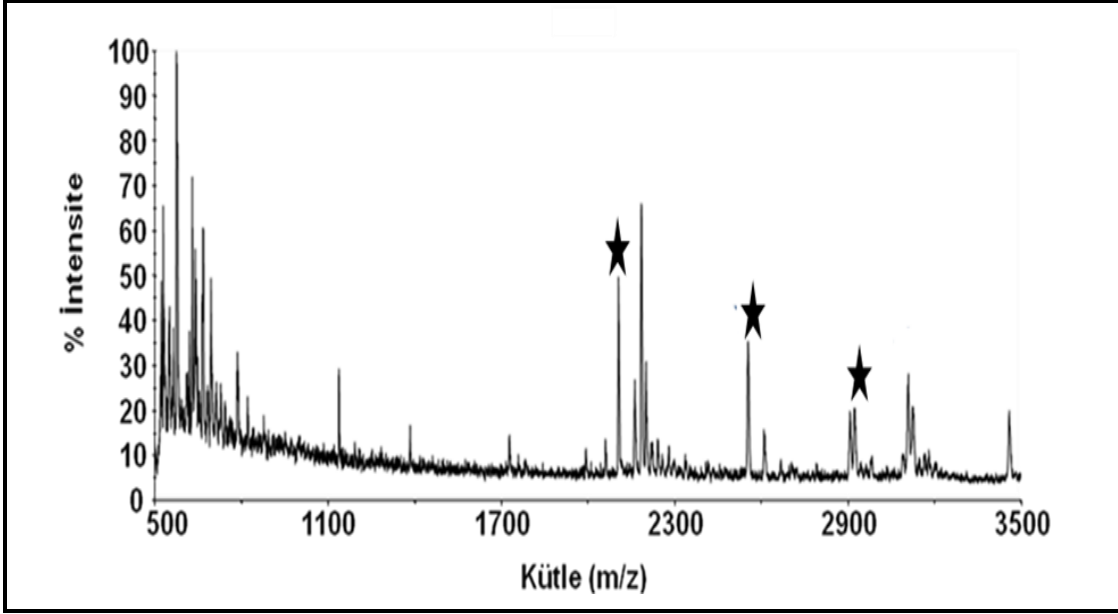
Peptit	Sekans	$[M + H]^+$ (monoizotopik)
$\beta 1$	FQ[pS]EEQQQTEDELQDK	2061,8285
$\beta 2$	IEKFQ[pS]EEQQQTEDELQDK	2432,0501
$\beta 3$	FQ[pS]EEQQQTEDELQDKIHPE	2555,2241
$\beta 4$	RELEELNVPGEIVE[pS]L[pS][pS][pS]EESITR	3123,3824



Şekil 4.1. Bakır (II) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.

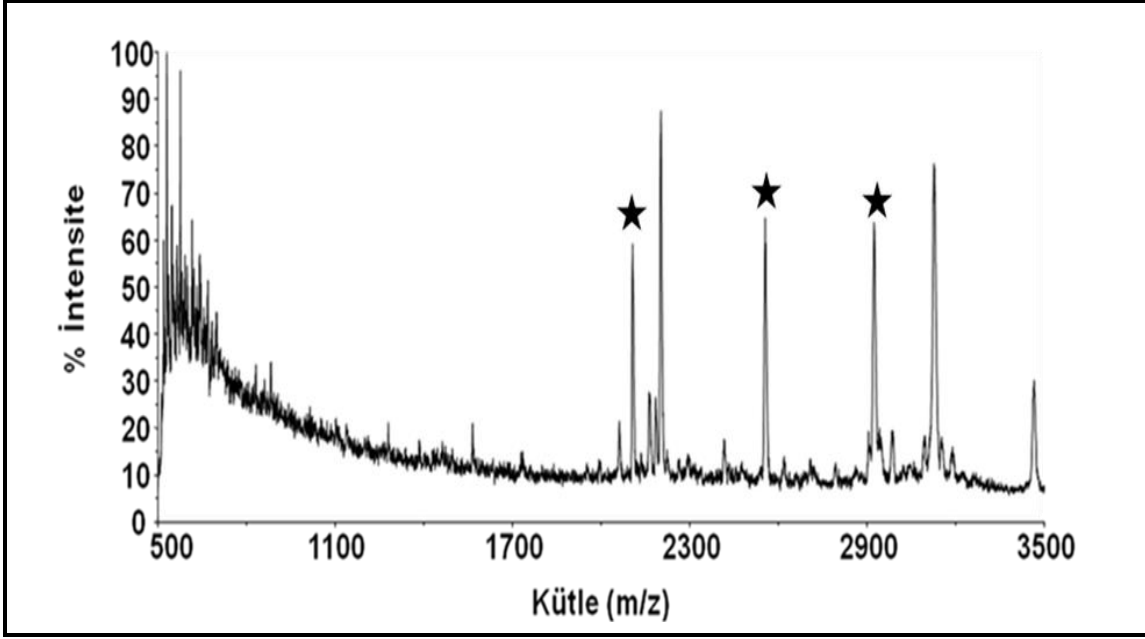
Şekil 4.1’ de fosfopeptitlerin bakır oksit yüzeyine adsorbe olduktan sonra bakır oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu verilmiştir. Yıldızla işaretlenen pikler fosfopeptitleri göstermektedir. Spektrumdan görüldüğü gibi bakır oksit yüzeyinde fosfopeptitler dışında çok sayıda peptit tutunmuştur. Adsorpsiyon koşullarında fosfopeptitler dışındaki diğer peptitler deprotonate olmadığından bakır oksit yüzeyine adsorbe olarak bakır oksitin fosfopeptitlere karşı seçiciliğini düşürmüşlerdir. Bu sebepten bakır oksit fosfopeptitler için özgün bir zenginleştirme yüzeyi olarak kullanışlı değildir.

Şekil 4.2’ de ise fosfopeptit adsorpsiyonundan sonra nikel oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu görülmektedir. Fosfopeptitler yıldız ile işaretlenmiştir. Nikel oksit de yine bakır oksit gibi fosfopeptitlere karşı yüksek bir seçicilik göstermemiştir. Ayrıca nikel oksit deney koşullarında çözündüğü için fosfopeptitlerde nikel katılmaları gözlenmektedir.

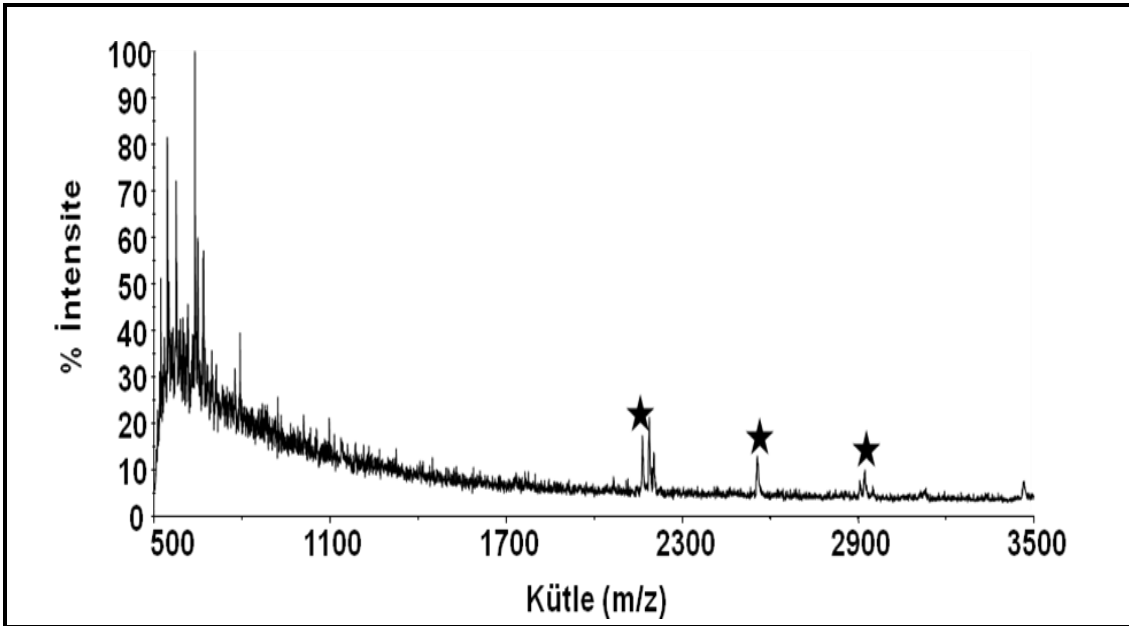


Şekil 4.2. Nikel (II) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.

Zenginleştirme sonrası zirkonyum oksit yüzeyi Şekil 4.3' de verilmiştir. Yıldızla işaretlenen pikler fosfopeptitleri göstermektedir. Fosfopeptitler zirkonyum oksite yüksek seçicilikle bağlanmıştır. Literatürden ve yapılan deneylerden çıkan sonuçlara dayanarak Zirkonyum oksitin, fosfopeptitler için kullanışlı bir zenginleştirme yüzeyi olduğu söylenebilir. Şekil 4.4' te ise zenginleştirme sonrası talyum oksit yüzeyi görülmektedir. Yıldız ile işaretlenen pikler fosfopeptitleri göstermektedir. Talyum oksit yüzeyinde yalnızca fosfopeptitlere ait sinyaller gözlenmektedir. Bu durumda talyum oksit fosfopeptit zenginleştirmek için uygun bir yüzey gibi görülebilir fakat talyumun tutma kapasitesi düşük olduğundan sinyallerin intensiteleri oldukça düşüktür. Bu durum sinyallerin gözlemlenebilirliğini düşürdüğünden talyum oksit, fosfopeptit zenginleştirmek için uygun bir aday değildir.



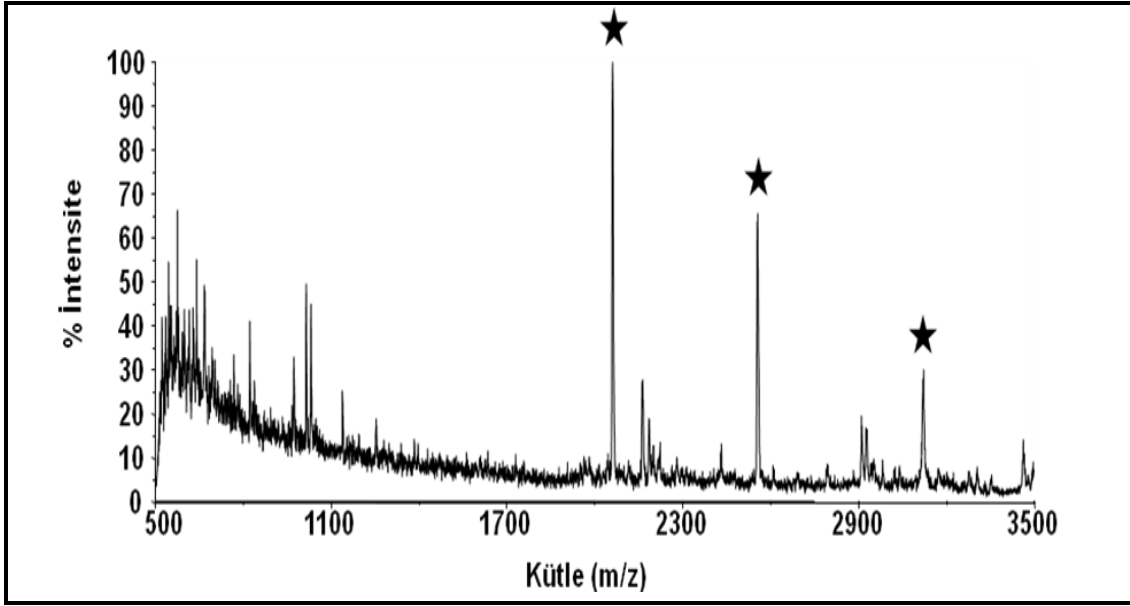
Şekil 4.3. Zirkonyum (II) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.



Şekil 4.4. Talyum (III) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.

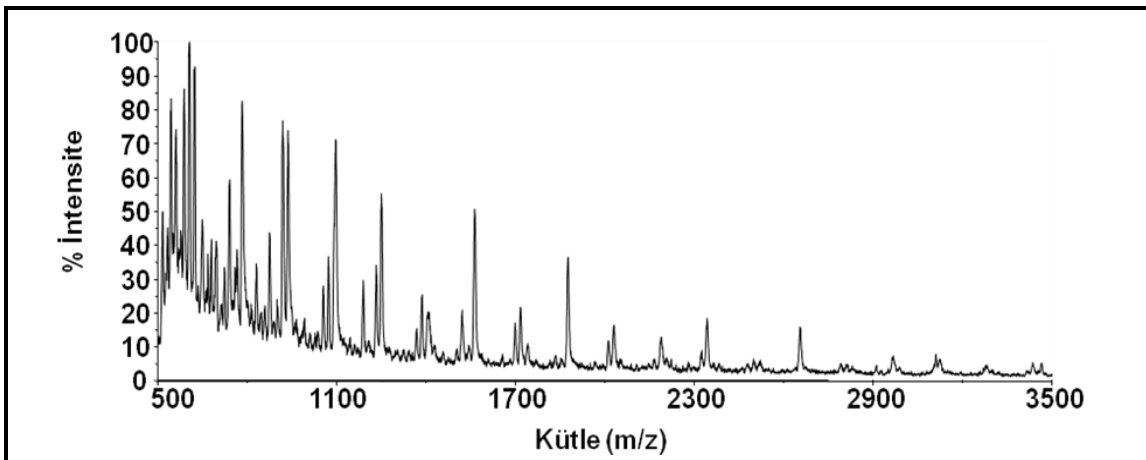
Demir oksit ise hem fosfopeptitlere yüksek seçicilikle bağlanmıştır hem de MALDI-MS ile doğrudan yüzey analizlerinde fosfopeptitler için intensitesi yüksek gözlemlenebilir sinyaller vermiştir (Şekil 4.5). Bu şekilde fosfopeptitlere ait sinyaller yıldız ile gösterilmiştir. Demir oksit fosfopeptitlere yüksek seçicilikle bağlandığından ve

gözlemlenebilir intensitesi yüksek sinyaller verdiğinden fosfopeptit zenginleştirilmesi için en uygun metal oksittir.

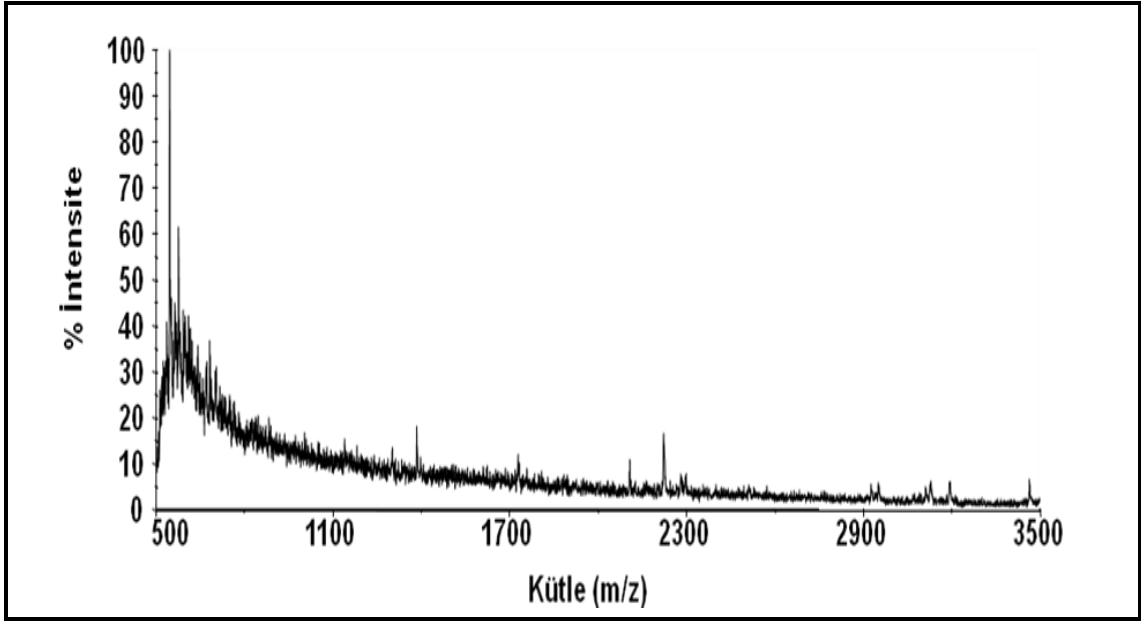


Şekil 4.5. Demir (III) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.

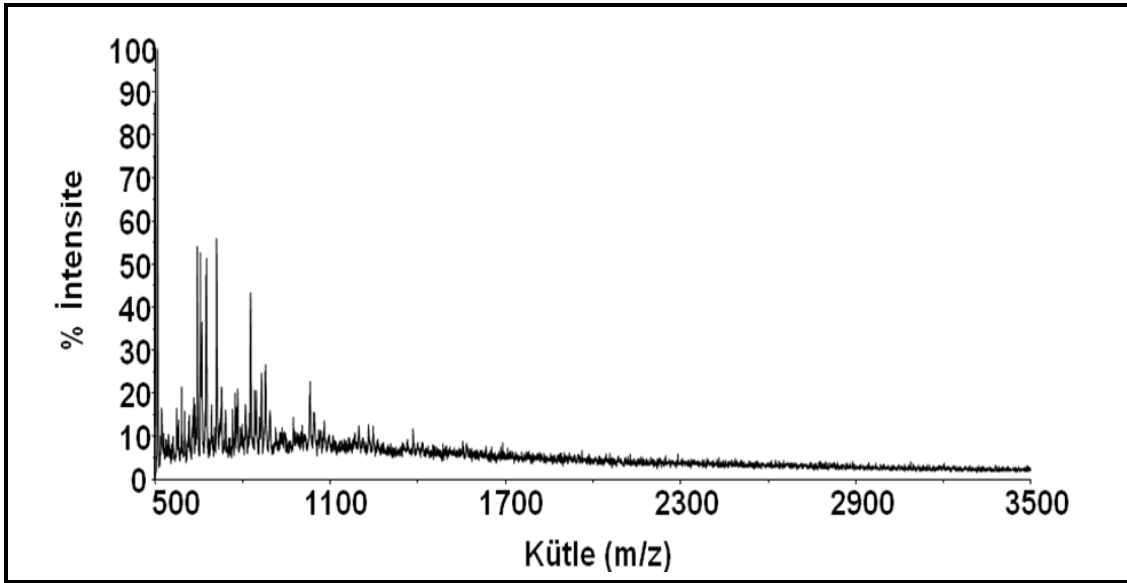
Disprosiyum oksit yüzeyinde ise, Şekil 4.6' dan görüldüğü üzere, zenginleştirme işlemi gerçekleşmemiş yani yüzeyde hiç fosfopeptit gözlemlenememiştir. Aynı durum şekil 4.7'deki gadolinyum oksit, şekil 4.8' de görülen vanadyum oksit ve şekil 4.9'daki çinko oksit içinde geçerlidir. Bu sonuçlara göre bu dört metal oksit yüzeyi fosfopeptit zenginleştirmek için uygun değildir diyebiliriz.



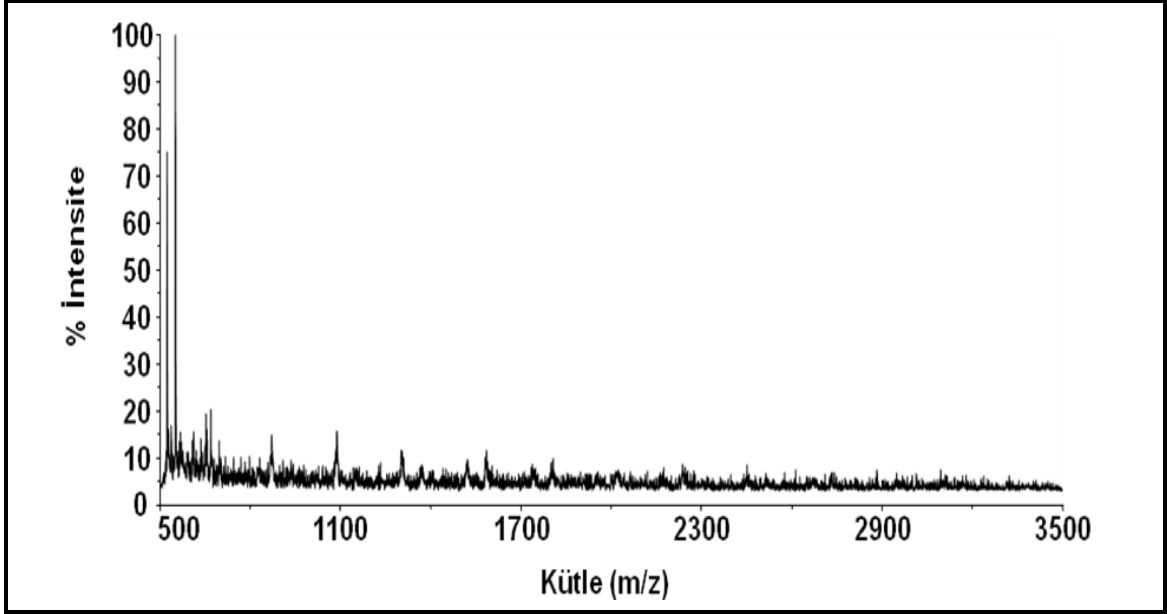
Şekil 4.6. Disprosiyum (III) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.



Şekil 4.7. Gadolinyum (III) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.

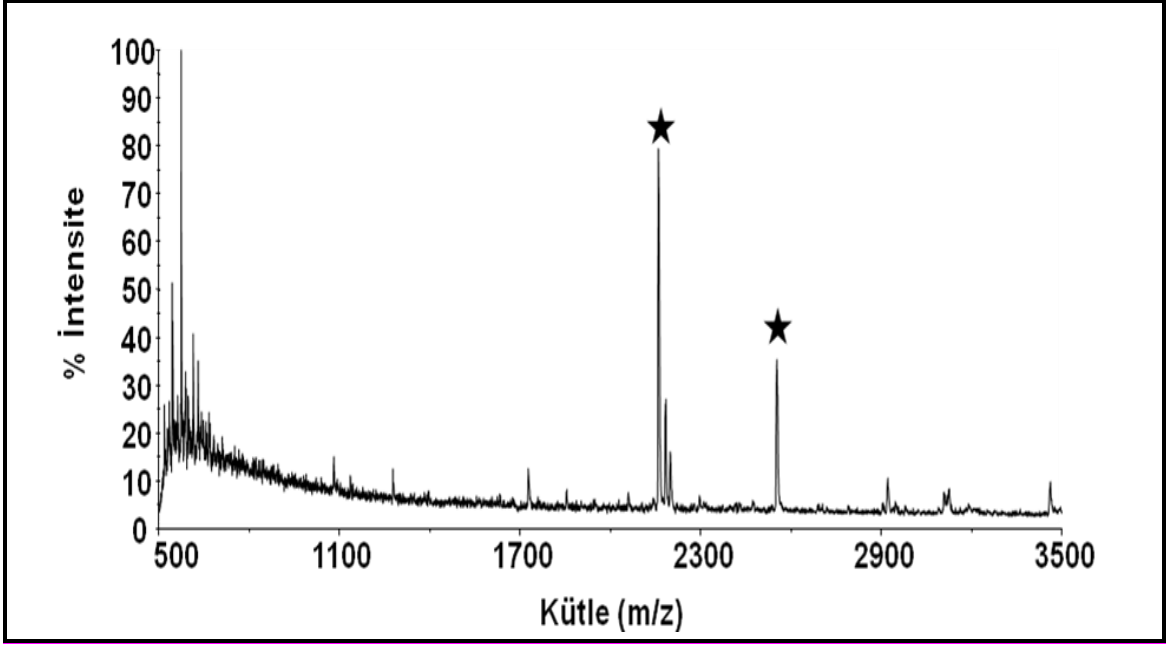


Şekil 4.8. Vanadyum (V) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.

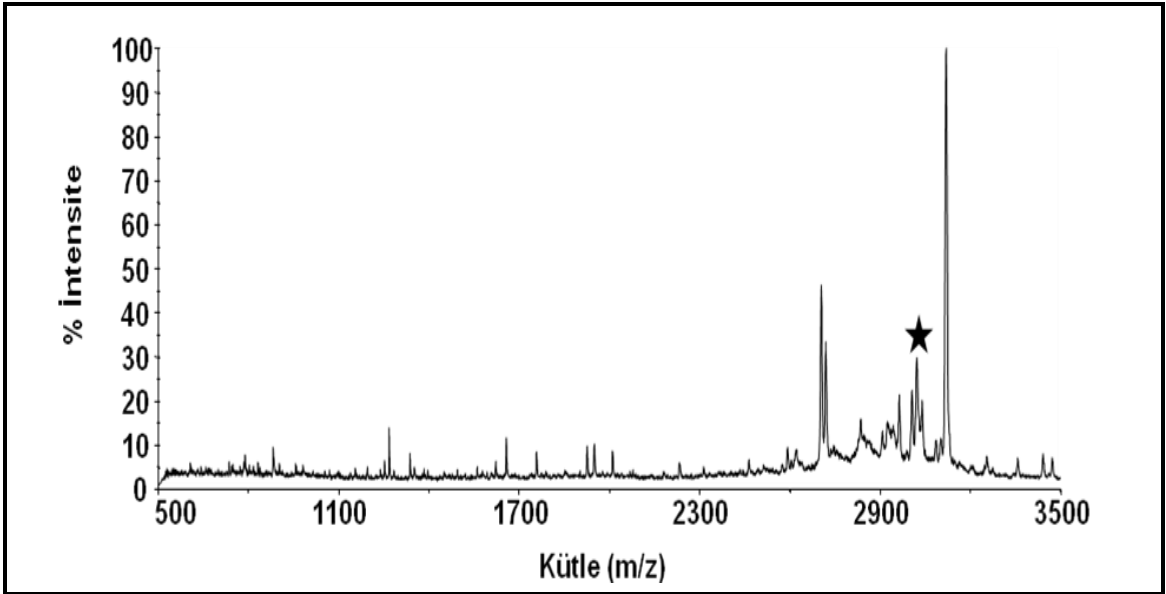


Şekil 4.9. Çinko (II) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.

Tantal oksit ise daha fazla miktarda fosfat grubu içeren yüksek kütleli fosfopeptiti yüzeyinde tutamamış fakat fosfatlanmamış başka birkaç peptiti yüzeyinde özgün olmayan bir şekilde adsorplamıştır (Şekil 4.10). Bu yüzden tantal oksit de iyi bir aday değildir. Molibden oksit te aynı şekilde fosfopeptitlere özgün davranmadığından iyi bir aday olarak bu çalışmada değerlendirilmemiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Tantal (V) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.



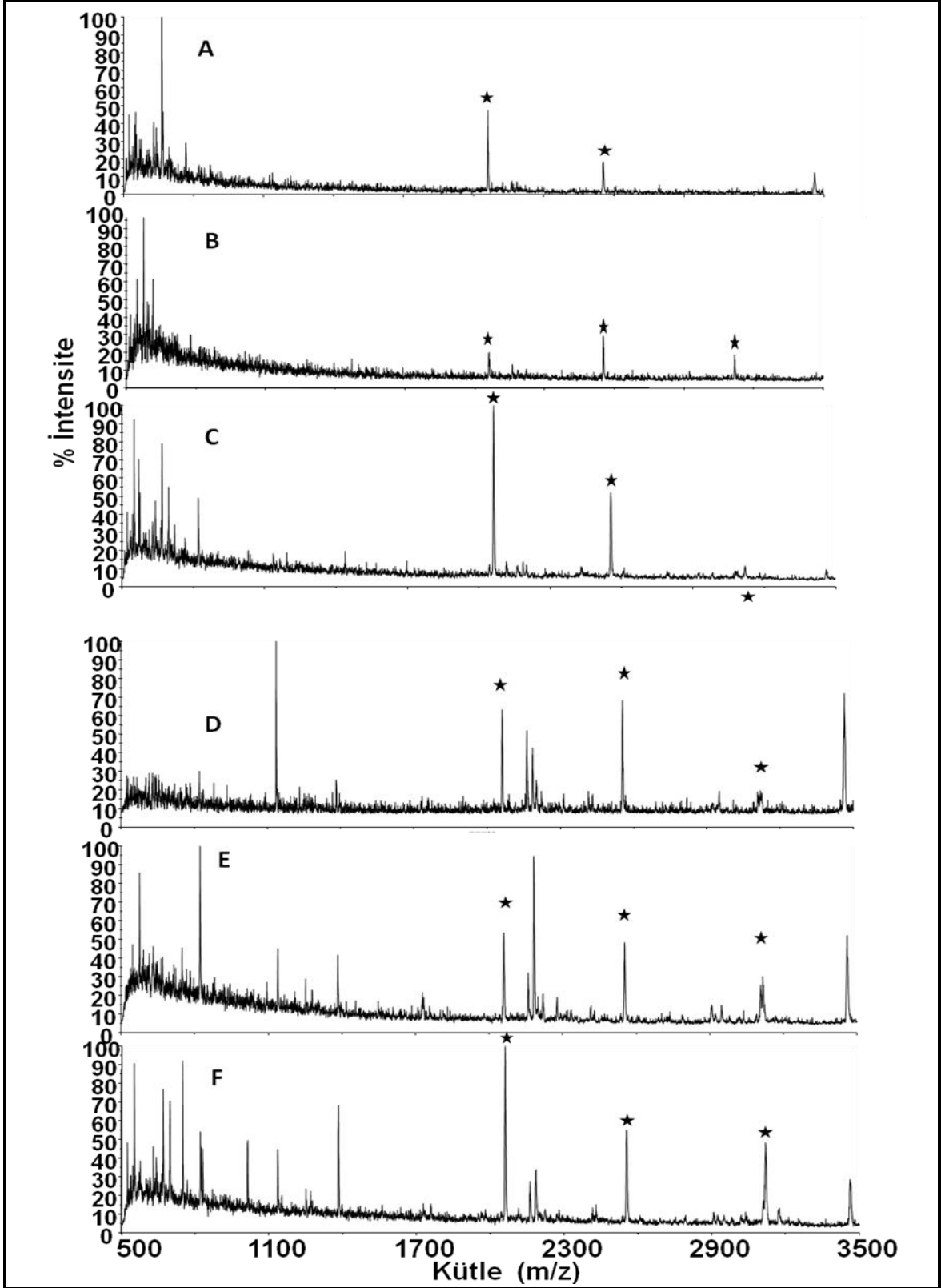
Şekil 4.11. Molibden (VI) oksit yüzeyinde beta-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi sonucu metal oksit yüzeyinden elde edilen MALDI-MS spektrumu.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde demir oksitin fosfopeptitlere en seçici davranan ve kütle spektrometrik koşullarda en gözlemlenebilir sonuçları veren metal oksit olduğu rahatlıkla söylenebilir. Bu sebeple çalışmanın bundan sonraki kısımlarında demir oksit üzerinde yoğunlaşılıp ve çalışmalar yapılmıştır.

4.2. Fosfopeptitlerin Metal Oksit Yüzeyinde Zenginleştirilmesi için En Uygun pH'nın Tespit Edilmesi

β -kazein içerisinde zenginleştirilen fosfopeptitlerin Demir (III) oksit yüzeyine adsorbe olabilmesi Demir (III) oksitin çözelti içerisinde pozitif halde fosfopeptidin ise negatif halde bulunması gerekmektedir. Bu durumu en iyi sağlayacak ortam asidik ortamdır. Fakat ortam pH'sı fazla düşürüldüğünde fosfopeptitlerin deprotone olma ihtimali artar. Bu durum adsorpsiyonu olumsuz yönde etkileyeceğinden tercih edilmeyen bir durumdur. Dolayısıyla adsorpsiyon için en uygun pH'yı tespit edebilmek amacıyla pH=1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 ve 4,0'da β -kazein içerisinde Demir (III) oksit kullanılarak fosfopeptit zenginleştirme çalışmaları yapılmıştır. Şekil 4.12A'da görüldüğü gibi pH=1,0'da yapılan adsorpsiyon denemesinde seçicilik çok yüksektir fakat intensiteler düşmüştür. Yüksek kütleli fosfopeptit (molekül ağırlığı 3223,38 Da) yüzeyde gözlemlenemeyecek kadar az miktarda bulunmaktadır. Yani Demir (III) oksitin seçiciği fazla fakat fosfopeptit tutma kapasitesi düşüktür. pH=1,5'e çıkarıldığında β -kazeinde bulunan dört fosfopeptitten bolluğu yüksek olan üç tanenin yüzeyde yüksek intensite ve seçicilikle tutunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12B). pH=2,0'a çıkarıldığında ise Demir (III) oksitin fosfopeptit tutma kapasitesi artmış, intensiteler yükselmiş fakat seçicilik azalmıştır. Şekil 4.12C'de fosfopeptitlere ait intensitelerin arttığı fakat fosfatlanmamış peptitlere ait sinyallerinde gözlemlenmeye başladığı görülmektedir. pH=2,5'e çıkarıldığında seçiciliğin daha da düştüğü Şekil 4.12D'de görülmektedir. pH=3,0'a çıkarıldığında fosfatlanmamış birçok peptidinde Demir (III) oksite yüksek intensitelerle tutunmaya başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.12E). pH=4,0'a çıkarıldığında ise Demir (III) oksit seçiciliğini tamamen kaybetmiş ve tüm peptitleri tutabilen bir yüzey haline gelmiştir (Şekil 4.12F).

Tüm bu sonuçlar incelendiğinde Demir (III) oksitin düşük pH'larda çok seçici daha seçici olduğu ve pH düştükçe seçiciliğinin arttığı görülmektedir. Fakat fosfopeptit zenginleştirme işleminde pH çok kritik bir faktördür. Belli bir düşüklüğe kadar adsorpsiyonda seçiciliği sağlarken, fazla asidik ortamlarda fosfopeptitler deprotone olduğundan Demir (III) oksit yüzeyine adsorbe olamayarak intensiteyi düşürmektedir. pH yükseltildikçe Demir (III) oksit yüzeyinin tutma kapasitesi artmıştır fakat seçicilik bununla ters orantılı bir şekilde düşmüştür.



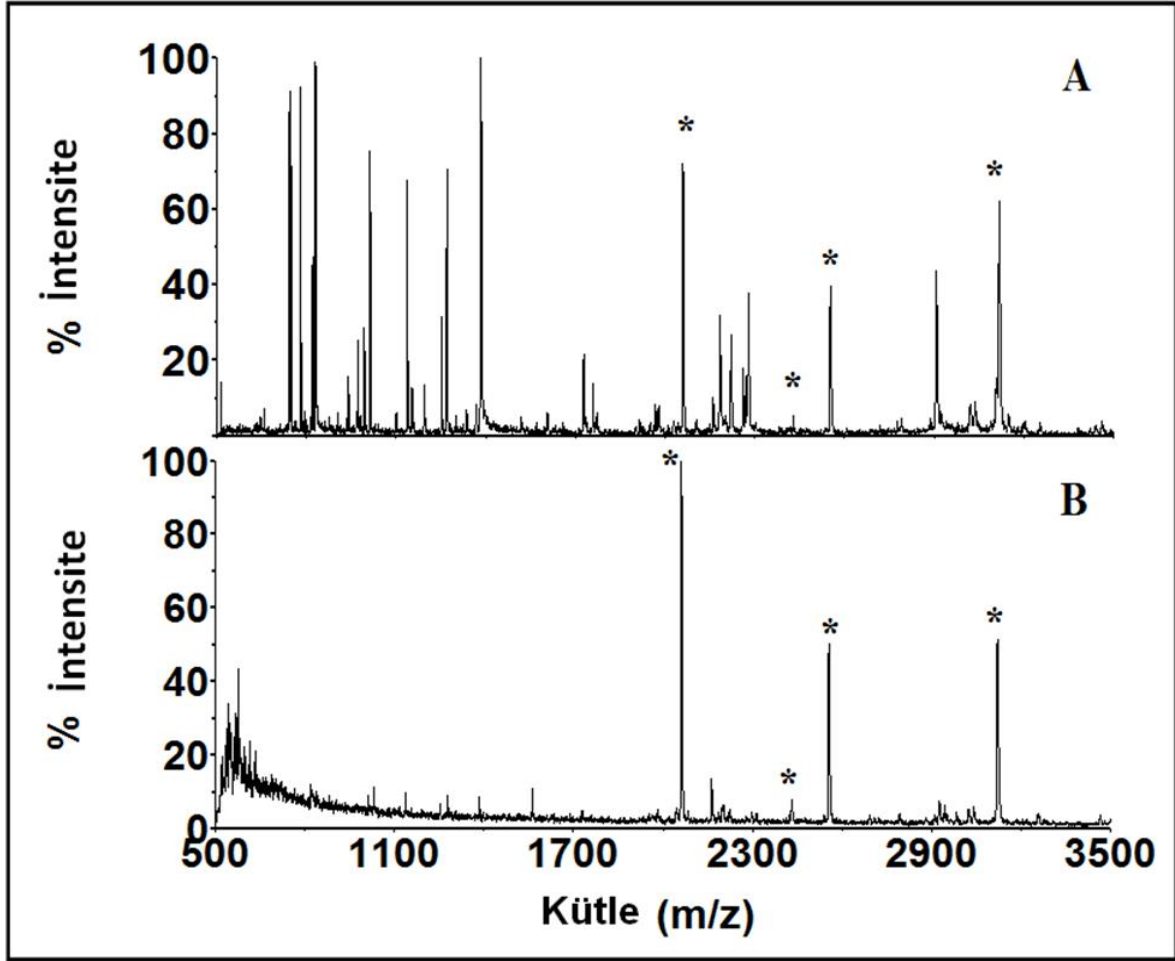
Şekil 4.12. β -kazein enzimatik parçalanma çözeltisi içerisinde (A) pH=1,0'da, (B) pH=1,5'te, (C) pH=2,0'da, (D) pH=2,5'te, (E) pH=3,0'da ve (F) pH=4,0'da yapılan fosfopeptit adsorpsiyonları sonrası Demir (III) oksit yüzeyleri. İşaretli pikler fosfopeptitleri göstermektedir.

4.3. Fosfopeptitlerin Metal Oksit Yüzeyinde Zenginleştirilmesi ve Doğrudan Metal Oksit Yüzeyinden Analizleri

β -kazeinin enzimatik parçalanma çözeltisi, fosfatlanmamış peptitleri de içeren bir fosfopeptit kaynağı olarak kullanılmıştır. β -kazein enzimatik parçalanma çözeltisi dört farklı fosfopeptit bulundurmaktadır. Bunlardan protonlanmış moleküler kütlesi 2433,10 Da olan fosfopeptitin derişimi oldukça düşüktür. β -kazein içerisindeki diğer fosfopeptitlerin monoizotopik kütleleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Pozitif iyon ve lineer modda alınan MALDI kütle spektrumları bu çözeltden DHB matriksi kullanılarak alınmıştır. Bu MALDI-MS spektrumu Şekil 4.13A'da verilmiştir.

Şekil 4.13A'da dört fosfopeptitin yanısıra, birçok başka fosfatlanmamış peptit türleri de görülmektedir. Bu çözelti metal oksit yüzeyinde özgün ayırma ve zenginleştirme için kullanılmıştır. Demir oksit zenginleştirme yüzeyi olarak kullanılmıştır. β -kazein enzimatik parçalanma çözeltisinin pH'sı 1,5'e ayarlanmıştır. pH'nın 1,5'e ayarlanması diğer asidik fosfatlanmamış türlerin adsorpsiyonunu azaltmaktadır. Çünkü 1,5 pH'da yan zincirinde asidik deprotone olabilen gruplar bulunan aminoasitlerin var olduğu peptitlerde bu gruplar protone olacaklarından dolayı yüzeye ilgi göstermeyeceklerdir. Ancak aynı pH'da fosfat grupları hala deprotone durumda bulunduğundan negatif yük taşıyacaklarından dolayı yüzeye aktivite göstermeye devam edeceklerdir. Bu nedenlerden dolayı pH=1,5 bu tür uygulamalar için oldukça kullanışlıdır. Çünkü bu pH'da fosfopeptitler deprotone halde, fosfatlanmamış türler protone halde, metal oksit yüzeyi ise kısmi olarak asidik (yani pozitif) halde bulunur. Yani pH'yı 1,5'e ayarlama yapılarak diğer asidik fosfatlanmamış türlerin metal oksit yüzeyine adsorbe olmasına engel olunur. β -kazein enzimatik parçalanma çözeltisi, demir oksit ile muamele edildikten sonra, demir oksit çözeltden santrifüjlenerek ayrılır ve diğer istenmeyen türlerin yüzeyden ayrılması için yıkanır. Demir oksit MALDI matriks çözeltisi olan 20 mg/mL derişimindeki 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) ile karıştırılıp ve karışımın 1 μ L'si MALDI örnek plakasına uygulandı. Örnek kuruduktan sonra analizi yapılır. Bu analizin sonucu elde edilen MALDI kütle spektrumu Şekil 4.13B'de verilmiştir. Bu analiz pozitif iyon ve lineer modda alınmıştır. Ayırmanın seçiciliği ve fosfopeptitlerin zenginleştirilmesi, desorpsiyon basamağı olmaksızın doğrudan demir oksit yüzeyinden analizi oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlar demir oksit yüzeyinde fosfopeptit zenginleştirilmesi ve ayrılmasının pH=1,5'den daha düşük pH'lerde daha etkili olduğunu göstermiştir. Ancak seçicilik artmasına rağmen fosfopeptit sinyallerinin şiddetinde azalmalar gözlemlendiğinden pH=1,5 olarak seçilmiştir.

Ayrıca yine bu sonuçlara dayanarak desorpsiyon basamağının elimine edilebileceği ve MALDI kütle spektrumlarının aynı başarı ile demir oksit yüzeyinden alınabileceği tespit edilmiştir.



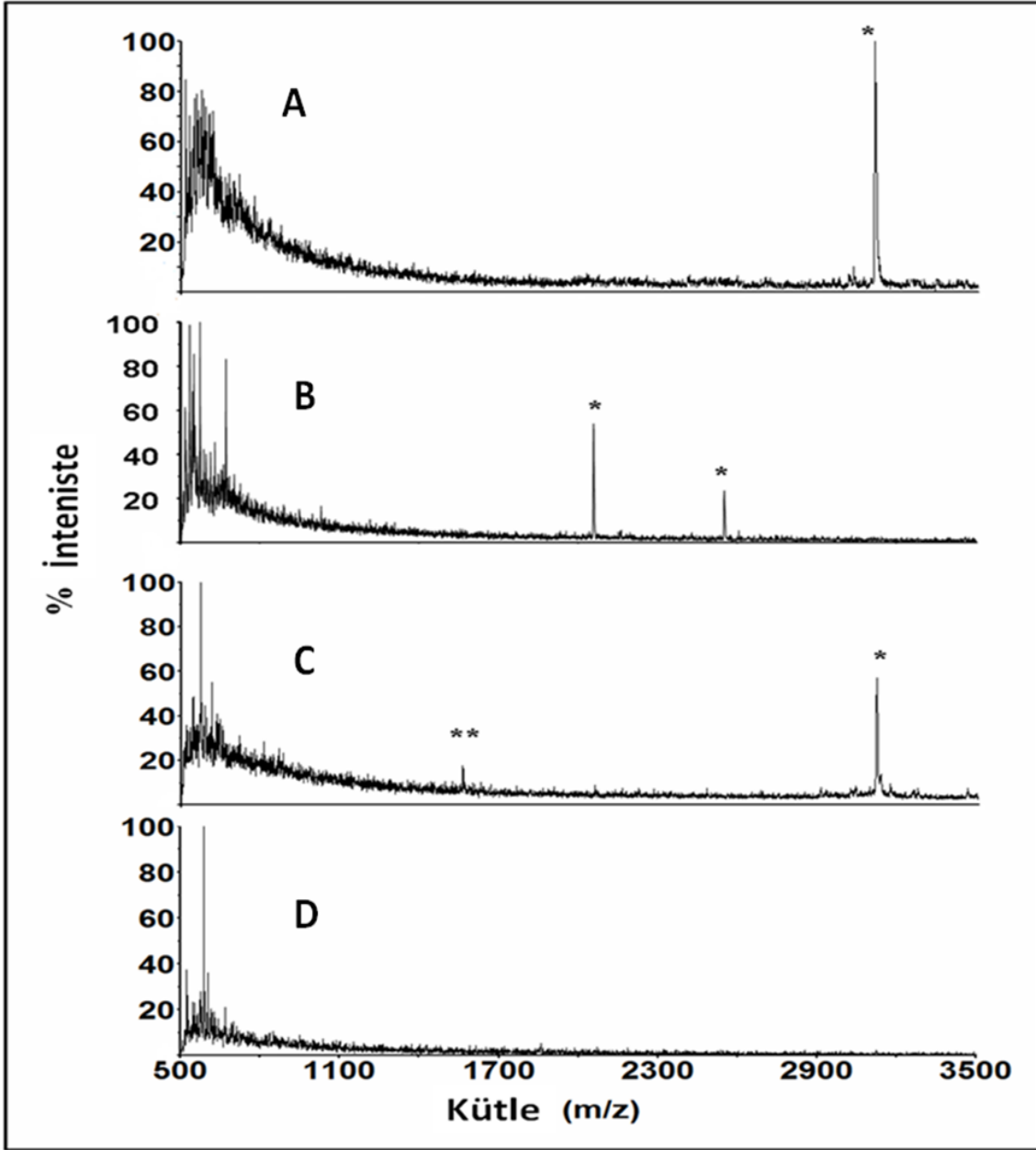
Şeki 4.13. β -kazein peptit çözeltisinin pozitif iyon ve lineer moda alınmış MALDI-MS spektrumları. (A) Doğrudan çözülden ve (B) çözeltinin Demir (III) oksit ile muamelesinden sonra Demir (III) oksit yüzeyinden.

4.4. Fosfopeptitlerin Metal Oksit Yüzeyinden Desorbe Olmasına pH Etkisi

Fosfopeptitler metal oksit yüzeyinden desorpsiyon yapılmadan MALDI-MS ile doğrudan analiz edilebilseler de, ESI-MS gibi birkaç kütle spektrometrik yöntem için fosfopeptitlerin çözültiye alınması gerekmektedir. Ayrıca fosfopeptitler metal oksit yüzeyinden desorbe edildikten sonra metal oksit tekrar kullanılabilir durumda olduğundan aynı metal oksit tekrar tekrar kullanıma uygun olmaktadır. Bu nedenle fosfopeptitlerin, metal oksit yüzeyinden desorbe edilebilmesi amacıyla pH=2,0'dan 8,0'a çekilerek incelemeler

yapılmıştır. Bilindiği üzere metal oksitlerin yüzeyinin asitliği ortam pH'sı arttıkça azalmaktadır. Bu yüzden fosfopeptitlerdeki fosfat grupları, metal oksit yüzeyine sadece bazı pH' larda tutunabilmektedir. Bu nedenle ortamın pH' sını artırmak fosfopeptitlerin metal oksit yüzeyinden ayrılmasını sağlayacaktır. Bu amaçla ortam pH'sını artırmak fosfopeptitlerin metal oksitlerden ayrılmasını sağlayacaktır. Bu amaçla ortam pH' sını 8,0'a artırılarak fosfopeptitler yüzeyden ayrılmış ve metal oksit yüzeyi doğrudan MALDI-MS ile analiz edilmiştir. Bu amaçla yüzeyden alınan MALDI-MS spektrumu Şekil 4.14A'da verilmiştir. Burada tek ve çift fosfat grubu bulunduran düşük molekül kütleli üç fosfopeptidin yüzeyden ayrıldığı ancak dört fosfat grubu bulunduran yüksek molekül ağırlıklı (molekül ağırlığı 3223,38 Da) olan fosfopeptidin ayrılmadığı görülmektedir. Şekil 4.14B' de pH=8,0' a çıkarıldıktan sonra yüzeyden ayrılıp çözeltiliye alınan fosfopeptitlerin MALDI-MS spektrumu verilmiştir.

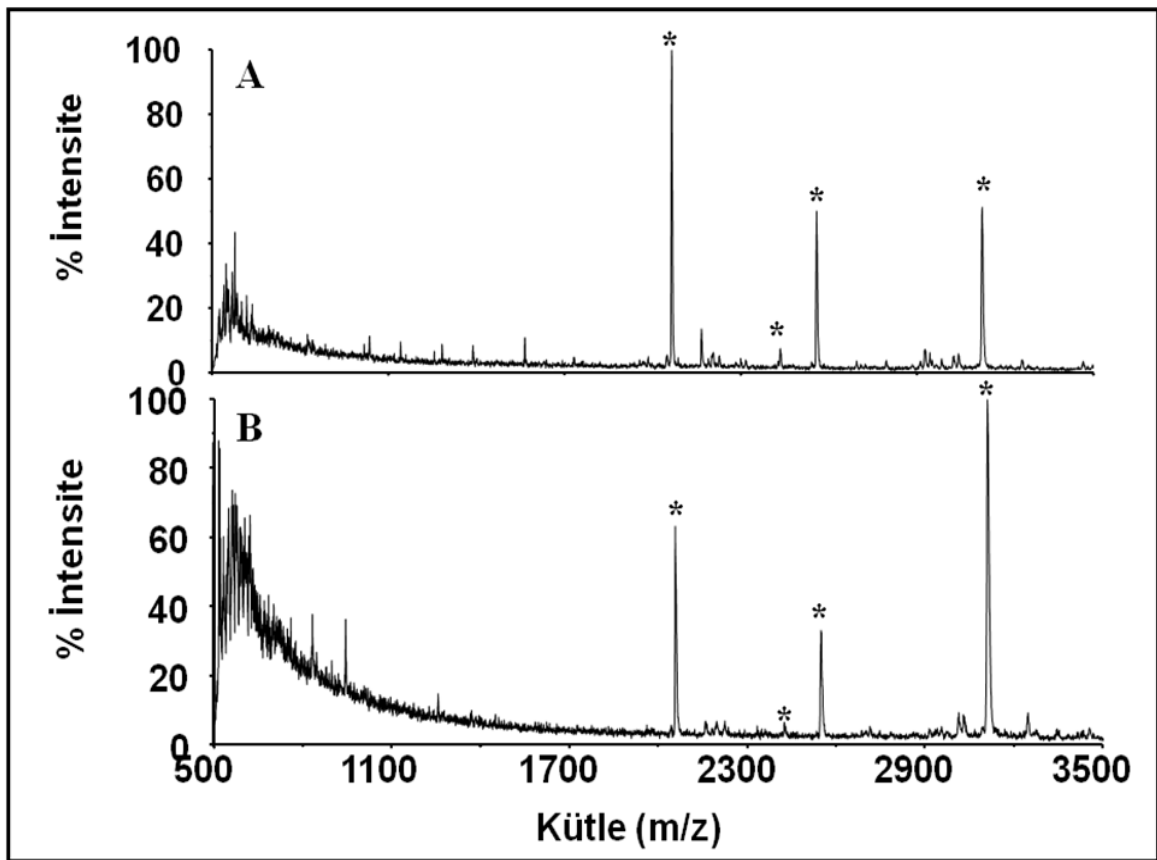
Daha sonra ortam pH'yı 8,0' dan 11,0' a çıkarılıp desorpsiyon yapıp desorpsiyon çözeltilisi MALDI-MS ile analiz edilince yüksek molekül ağırlıklı fosfopeptidin de çözeltiliye geçtiği yani yüzeyden desorbe edildiği gözlemlenmiştir. Bu spektrum Şekil 4.14C' de verilmiştir. Burada yüksek iyon şiddeti verimi ile kendisi ve iki yüklü halinin rahatlıkla gözlemlendiği belirlenmiştir. pH=11' e çıkarıldıktan sonra desorpsiyon yapıldığında metal oksit yüzeyi analiz edildiğinde ise yüzeyde hiçbir fosfopeptit kalmadığı görülmektedir. Bu spektrum ise Şekil 4.14D' de verilmiştir.



Şekil 4.14. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu (A) pH=8,0'de desorpsiyon sonrası demir oksit yüzeyi, (B) pH=8,0'de demir oksit yüzeyinden desorbe edilen desorpsiyon çözeltisi, (C) pH=8,0'deki desorpsiyon sonrası pH=11,0' e çekilerek yapılan desorpsiyonun çözeltisi ve (D) pH=11,0'de desorpsiyon sonrası demir oksit yüzeyi. *ile gösterilenler ise fosfopeptitlere ait, ** ile gösterilen fosfopeptitin çift yüklü haline ait sinyallerdir.

4.5. Fosfopeptitlerin MALDI-MS ile Analizinin Çözeltide ve Metal Oksit Yüzeyinde Analizinin Karşılaştırılması

Fosfopeptitlerin desorpsiyon olmaksızın metal oksit yüzeyinden analiz edilmelerinin başarısını ölçmek için, fosfopeptitler demir oksit üzerinde zenginleştirildikten sonra öncelikle demir oksit yüzeyinde daha sonra pH=11,0' a çekilip desorbe edilerek, elüsyon çözeltisi MALDI-MS ile analiz edilmiş ve sonuçları Şekil 4.15A ve Şekil 4.15B' de karşılaştırılmıştır. Şekil 4.15A ve Şekil 4.15B arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlara dayanarak fosfopeptitlerin zenginleştirme sonrası, desorpsiyon basamağına gerek olmaksızın demir oksit yüzeyinden hızlı ve pratik bir şekilde analiz edilebileceği rahatlıkla söylenebilir.

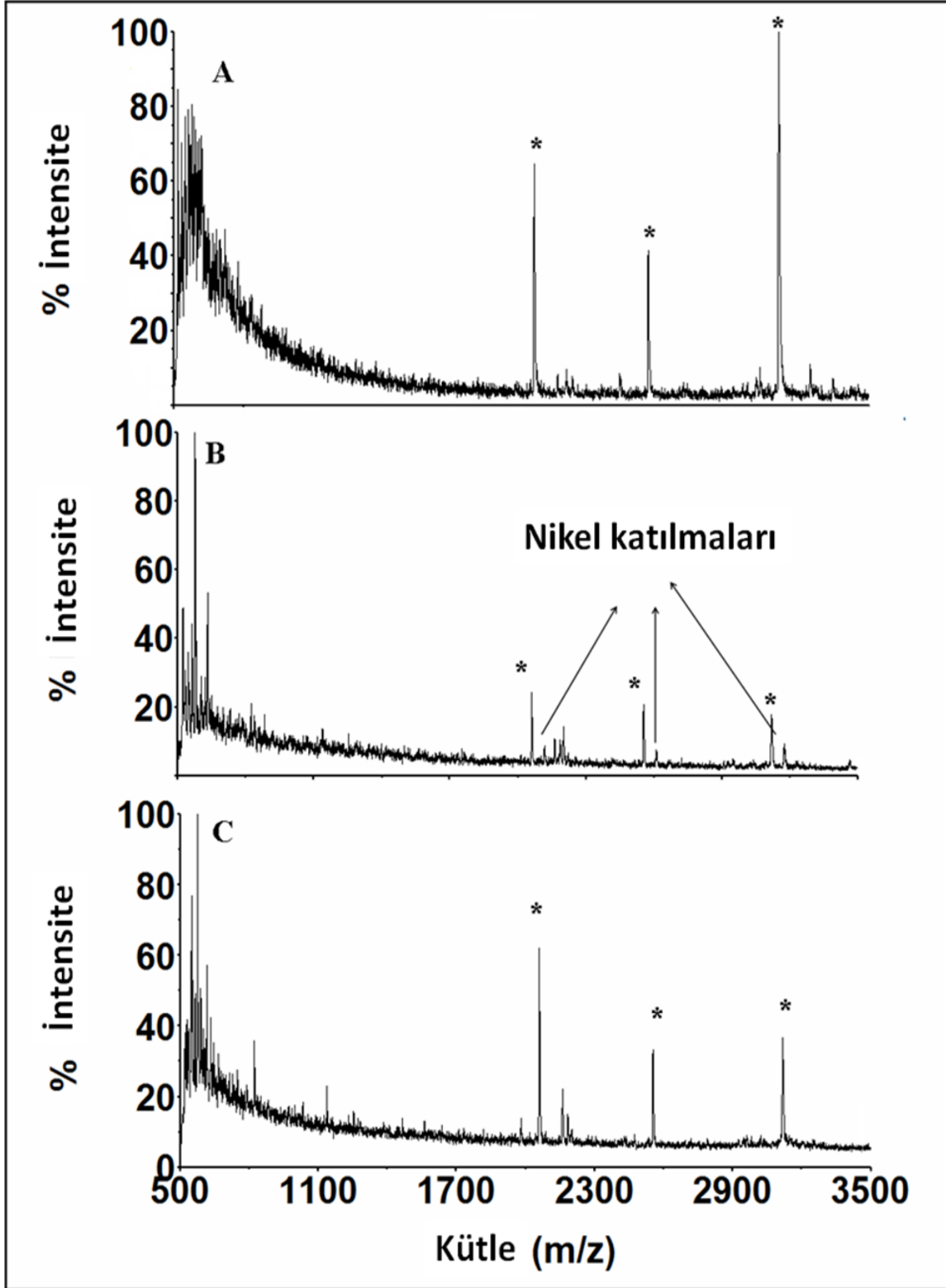


Şekil 4.15. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu. (A) pH=1,5'te β -kazein içerisinde özgün fosfopeptit zenginleştirilmesi sonucu demir oksit yüzeyi, (B) pH=11,0'de desorpsiyon sonrası desorpsiyon çözeltisi. * ile işaretlenen pikler fosfopeptitleri göstermektedir.

4.6. Metal Oksitlerin, Fosfopeptitlerin Özgün Ayrılması ve Zenginleştirilmesindeki Etkinliği

Bakır (II) oksit, Molibden (VI) oksit, Çinko (II) oksit, Nikel (II) oksit, Zirkonyum (IV) oksit, Vanadyum (V) oksit, Demir (III) oksit, Gadolinyum (III) oksit, Tantal (V) oksit, Disprosyum(III) oksit, Talyum(III) oksit bileşikleri ile fosfopeptit zenginleştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar ile özgün fosfopeptit zenginleştirme çalışmaları için en uygun şartlar belirlenmiştir.

Demir oksit, nikel oksit ve zirkonyum oksit denenen metaller içerisinde sonuçları göreceli olarak en iyi olan yani fosfopeptitlere en seçimli davranan üç metal oksit olarak belirlenmiştir. Üç metal oksitte aynı β -kazein çözeltisi ile pH=1,5'te belirlenen en uygun koşullara göre muamele edilmiş ve MALDI kütle spektumları metaller yıkandıktan sonra metal oksitlerin yüzeyinden doğrudan (desorpsiyon basamağı olmaksızın) aynı MALDI-matriks çözeltisi ile alınmıştır. Bu üç metal oksit için alınan kütle spektumları Şekil 4.16'da verilmiştir. Şekil 4.16A'da fosfopeptit adsorpsiyonu gerçekleştikten sonra demir oksit yüzeyinden alınan MALDI kütle spektrumunu göstermektedir. β -kazein içerisinde bulunan dört fosfopeptitte kabul edilebilir intensitelerle gözlemlenebilmektedir. Nikel oksitte ise, fosfopeptitlere nikel katılmaları gözlemlenmiştir. Bu katılmalar, hedef fosfopeptit moleküllerinin intensitelerini düşürmektedir (Şekil 4.16B). Bu problem nikelin ortam şartlarında az miktarda çözünmesinden kaynaklanmaktadır. Fakat bu sonuçlara dayanarak nikel oksitin yinede fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılabileceği söylenebilir. Zirkonyum oksitin ise nikel göre fosfopeptitlere daha seçimli davrandığı görülmektedir (Şekil 4.16C). Fakat en iyi sonuçlar demir oksitte görülmektedir. Zirkonyum oksitte demir oksite göre hem daha az fosfatlanmış peptitler tutunmakta (iyon şiddetlerinden bu izlenmektedir), hem de daha çok sayıda fosfatlanmamış peptitler tutunma eğilimindedir. Bu durum en çarpıcı şekilde 3123,3824 Da moleküler kütleli fosfopeptitte görülmektedir. Demir oksit için ise bu durum tam tersidir.

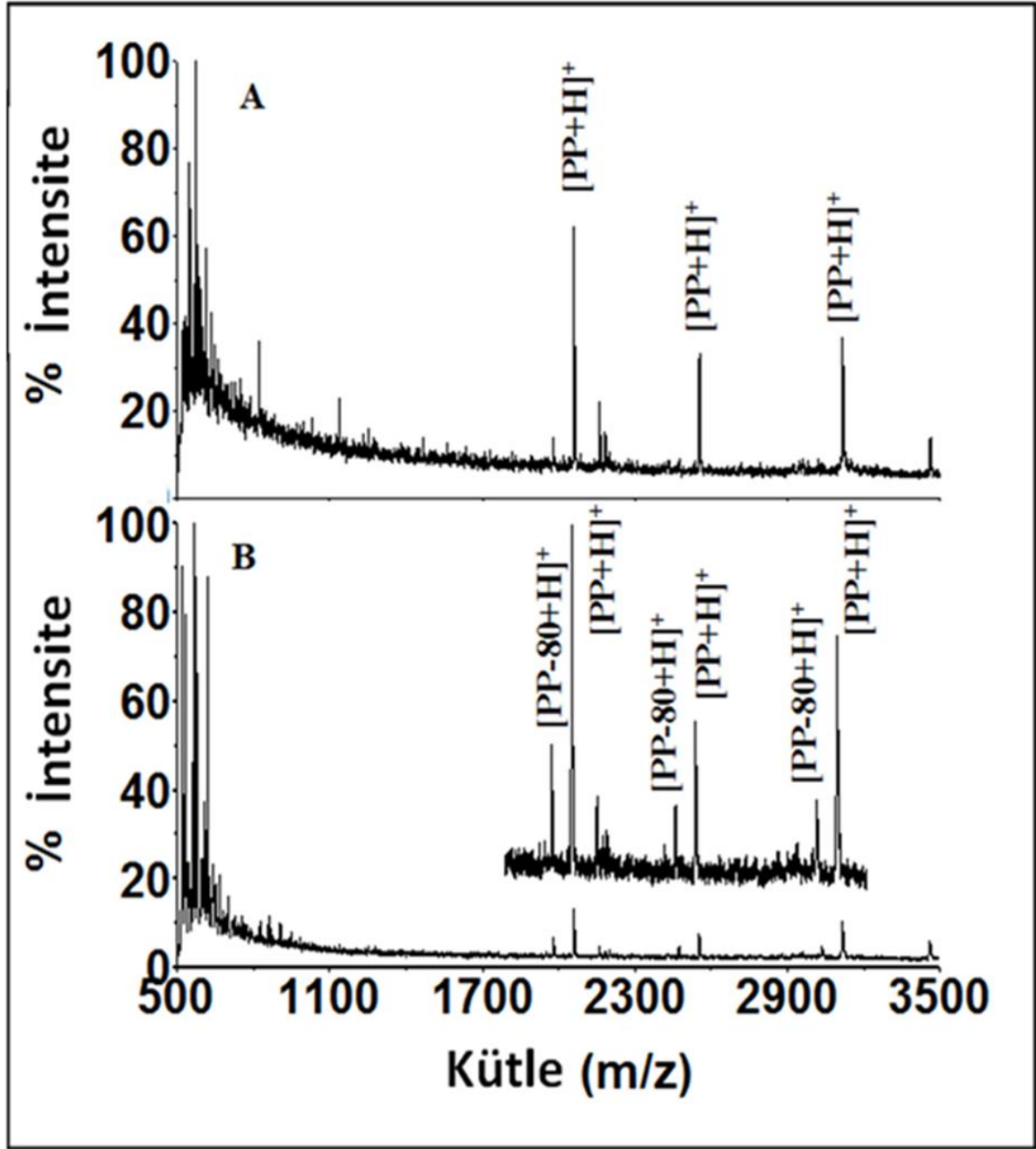


Şekil 4.16. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu β -kazein içerisinde özgün zenginleştirme sonrası (A) demir oksit yüzeyi, (B) nikel oksit yüzeyi ve (C) zirkonyum oksit yüzeyi. * ile gösterilen pikler fosfopeptitlere aittir.

4.7. Fosfopeptitlerin Kütle Spektrometrik Koşullar Altındaki Kararlılığının Metal Oksit Yüzeyinde ve Desorpsiyon Çözeltisinde Karşılaştırılması

Fosfopeptitlerin metal oksit yüzeyinde ve metal oksit yüzeyinden desorpsiyon çözeltisine alındıktan sonra desorpsiyon çözeltisinde kütle spektrometrik koşullar altındaki kararlılığı MALDI-MS kullanılarak analiz edilmiştir. İki analiz de aynı lazer enerjisi kullanılarak yapılmıştır ve sonuçlar kaydedilip karşılaştırılmıştır. Bu kütle spektrumları Şekil 4.17'de verilmiştir. Bu deneylerde metal oksit olarak zirkonyum oksit kullanılmıştır. Şekil 4.17A'daki spektrum doğrudan metal oksit yüzeyinden alınmıştır. Bu spektrum incelendiğinde fosfopeptitlerde parçalanma (fragmentation) görülmemektedir. Aynı lazer enerjisi kullanılarak fosfopeptitler metal oksit yüzeyinden desorbe edildikten sonra desorpsiyon çözeltisinde yine MALDI-MS analizi yapıldığında ise HPO_3 çıkışından kaynaklı bazı dikkat çekici parçalanmalar görülmektedir (Şekil 4.17B). Bu parçalanmalar lazer enerjisinden kaynaklanmaktadır. Lazer enerjisi düşürüldüğünde sinyal şiddeti kaybolmakta artırıldığında ise parçalanma olmaktadır ve bu problemin önüne geçilememektedir. Fosfopeptit analizlerinde en çok tercih edilen matriks olan DHB matriksi içerisine sinyal intensitesini artırmak için az miktarda H_3PO_4 eklenir. Bu şartlar altında lazer enerjisi fosfopeptitlerin parçalanmasında kritik bir rol oynar. Bu durumda metal oksit yüzeyi ve fosfopeptitler arasındaki bağ MALDI-MS analizinde lazer enerjisi artırıldığında fazla enerjinin bir kısmını absorblayacağından dolayı fosfopeptitlerin parçalanmasını ve iki yüklü (double charged) fosfopeptitlerin oluşmasını engellemektedir.

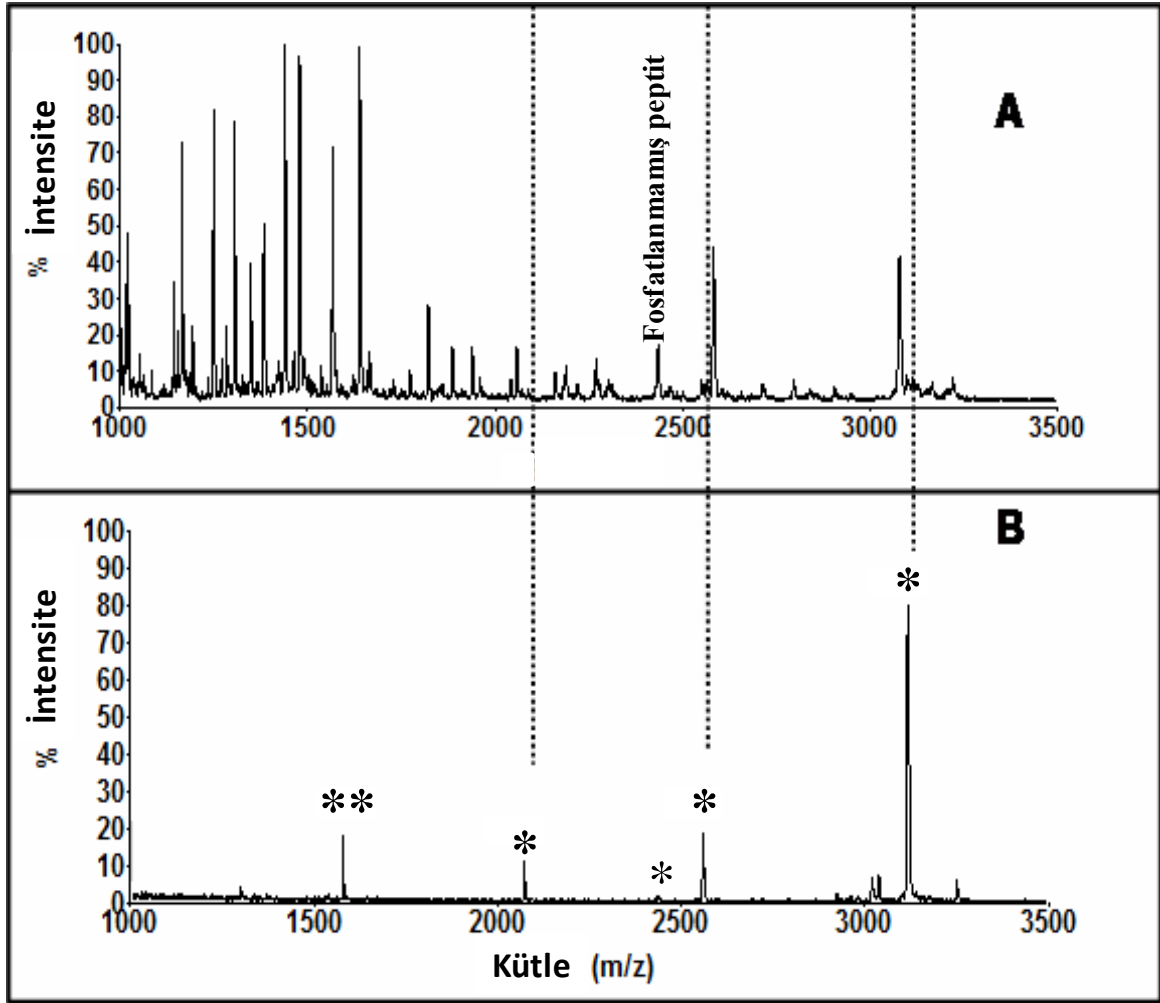
Fosfopeptitlerin desorpsiyon çözeltisindeki MALDI-MS analizlerinde lazer enerjisi daha kritik hale gelmektedir. Düşük lazer enerjisi kullanıldığında fosfopeptitlerin parçalanması azalmakta fakat protonlanmış moleküler iyon piklerinin şiddetleri de oldukça azalmaktadır. Protonlanmış moleküler iyon piklerinin şiddetlerini artırmak lazer enerjisi artırılması ile mümkün olmaktadır. Fakat bu durumda da protonlanmış fosfopeptitler parçalanmaya başlamaktadır, bu ise yine sinyal şiddetlerinin azalmasına sebep olmaktadır. Tüm bu durumlar gözönüne alındığında, fosfopeptitleri metal oksit yüzeyinden doğrudan analiz etmek, yüksek lazer enerjisi altında parçalanma olmaksızın yüksek sinyal şiddeti sağlayacağından, desorpsiyon çözeltisinde yapılan fosfopeptit analizlerine göre çok daha kullanışlıdır.



Şekil 4.17. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu β -kazein içerisinde özgül zenginleştirme sonrası (A) pH=1,5'te zirkonyum oksit yüzeyi ve (B) pH 11,0' de desorpsiyon çözeltisi. PP'ler fosfopeptitleri göstermektedir.

4.8. Fosfopeptitlerin β -kazein ile Karışık ve Derişik BSA Triptik Parçalanma Çözeltisi İçerisinden Zenginleştirilmesi

Düşük doğal bolluklara sahip fosfopeptitleri doğal örneklerden zenginleştirmek, standart proteinlerin triptik parçalanma çözeltileri içerisinden zenginleştirilmesinden çok daha zordur. Metal oksitler kullanılarak fosfopeptit zenginleştirme yönteminin daha karışık ortamlarda uygulanabilirliğini gözlemek amacıyla BSA'nın triptik parçalanma çözeltisi, β -kazeinin triptik parçalanma çözeltisi ile 100:1 mol oranında (BSA : β -kazein) karıştırılmıştır. Şekil 4.18A'da görüldüğü üzere zenginleştirme öncesi karışımdan alınan MALDI-MS spektrumunda hiçbir fosfopeptit gözlenememektedir. Çünkü ortam çok karmaşıktır ve bu ortamda fosfatlanmamış peptitlerin bolluğu fosfopeptitlere göre çok daha fazladır. Bu yüzden fosfopeptitlerin sinyalleri, BSA kaynaklı fosfatlanmamış türlerin bolluğu nedeniyle baskılanmıştır. Bu karmaşık ortamda bulunan ve çok düşük derişimlerde olan fosfopeptitler Demir (III) oksit kullanılarak pH=1,5' te zenginleştirilip, pH=11,00'da desorbe edildikten sonra desorpsiyon çözeltisinden alınan MALDI-MS spektrumu incelendiğinde β -kazeine özgü üç fosfopeptit açıkça, etkin sinyal şiddetleri ile birlikte görülmektedir (Şekil 4.18B). Bu sonuçlara dayanarak Demir (III) oksitin zenginleştirme çalışmalarında ne kadar yüksek bollukta fosfatlanmamış tür olursa olsun fosfopeptitlere yüksek seçimlilikle bağlanıp, desorbe olduğu rahatlıkla izlenebileceği tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. pozitif iyon lineer mod MALDI kütle spektrumu (A) β -kazein enzimatik parçalanma çözeltisi, BSA enzimatik parçalanma çözeltisi karışımı ve (B) pH=1,5' te özgün zenginleştirme sonrası pH=11,0' da desorpsiyon çözeltisi. * fosfopeptitleri, ** ise fosfopeptitlerin çift yüklü halini göstermektedir.

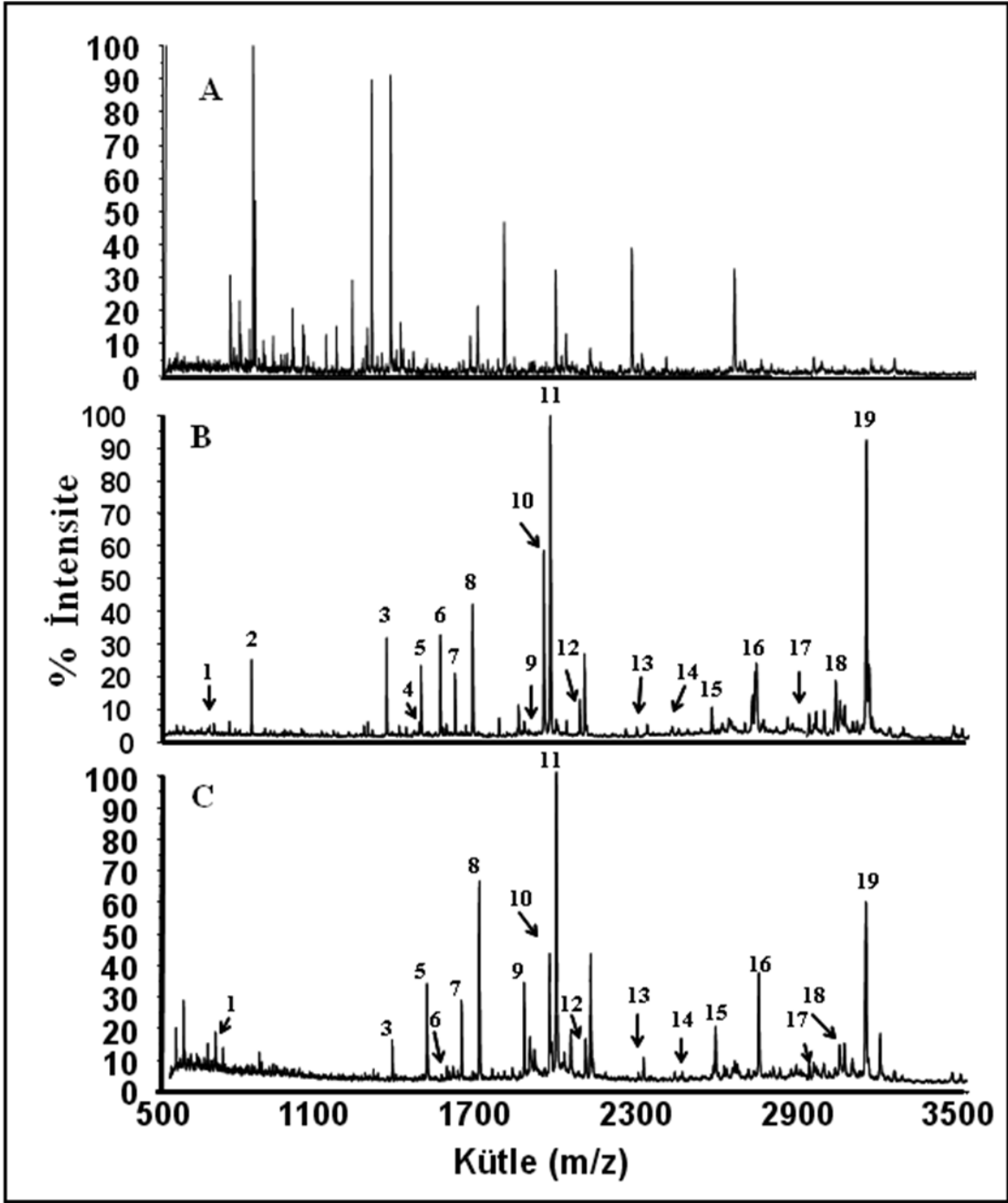
4.9. Yağsız İnek Sütünden Demir (III) oksit Kullanılarak Fosfopeptit Zenginleştirilmesi

Doğal örnekler her zaman daha karmaşık ve çok sayıda matriks içeren özelliğe sahiptirler. Demir (III) oksit ile fosfopeptitlerin daha karmaşık örnekler olan doğal örneklerdeki başarısını test etmek amacı ile yağsız inek sütü, üre ile denatüre edilerek kullanılmıştır. Yağsız inek sütü denatüre edildikten sonra enzimatik olarak parçalanmıştır. Şekil 4.19A'da yağsız inek sütünün enzimatik parçalanma çözeltisinin MALDI-MS spektrumu görülmektedir. Şekil 4.19A' da görüldüğü üzere fosfopeptitlere ait iyon sinyalleri gözlemlenememektedir. Bununla birlikte oldukça karışık bir kütle spektrumu elde edilmiştir. Demir (III) oksit kullanılarak fosfopeptit zenginleştirilmesi yapıp pH=11,0' da

demir oksit yüzeyinde zenginleştirilen fosfopeptitler desorbe edildikten sonra pozitif iyon lineer modda yapılan MALDI-MS analizi sonucunda elde edilen MALDI-MS spektrumu Şekil 4.19B’de verilmiştir. Burada yağsız inek sütünün enzimatik parçalanma çözeltisinden 19 farklı fosfopeptitin seçimli olarak ayrıldığı görülmektedir. Aynı zamanda fosfopeptitler desorbe edilmeden önce Demir (III) oksit yüzeyinden direk olarak MALDI-MS ile analiz edilmiş ve elde edilen spektrum Şekil 19C’de verilmiştir. Tüm bu veriler incelendiğinde karmaşık örnekler olan doğal örneklerde Demir (III) oksit kullanılarak fosfopeptit zenginleştirilmesinin başarılı bir yöntem olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.19B ve Şekil 4.19C karşılaştırıldığında desorpsiyon basamağına gerek olmadan fosfopeptitler Demir (III) oksit yüzeyinden MALDI-MS ile analiz edildiğinde matriks etkisinin azaldığı, iki yüklü iyon oluşumunun ve HPO_3 çıkışından kaynaklı fosfopeptit parçalanmasının engellendiği görülmüştür. Bunlara dayanarak Demir (III) oksit yüzeyinden MALDI-MS analizi yapmanın daha etkin bir yöntem olduğu açıkça söylenebilmektedir. Yağsız inek sütünde bulunan fosfopeptitler (Tablo 4.2’ de verilmiştir). Deneysel sonuçlarla karşılaştırıldığında yağsız inek sütünde bulunan en az 20 farklı fosfopeptidin Demir (III) oksit kullanılarak zenginleştirilebildiği açıkça görülebilmektedir.

Tablo 4.2: Yağsız inek sütünün enzimatik parçalanması sonucu elde edilen fosfopeptitlerin monoizotopik kütleleri ve amino asit dizilimleri. Fosfatlanma bölgeleri pS, pT, pY ile gösterilmiştir.

No	[M + H] ⁺ (monoizotopik)	Fosforilasyon Sayısı	Protein	Dizilim
1	695,2946	1	α S1- kazein	LH[pS]MK
2	828,3387	1	α S1- kazein	T[pT]MPLW
3	1339,6076	1	α S2- kazein	QEKMAINP[pS]K
4	1459,6312	1	α S2- kazein	EQL[pS]TSEENSKK
5	1466,6121	1	α S2- kazein	TVDME[pS]TEVFTK
6	1539,5975	2	α S2- kazein	EQL[pS]TSEENSKK
7	1594,7070	1	α S2- kazein	TVDME[pS]TEVFTKK
8	1660,7942	1	α S1- kazein	VPQLEIVPN[pS]AEER
9	1834,6060	4	α S2- kazein	K[pT]VDME[pS][pT]EVF[pT]K
10	1927,6916	2	α S1- kazein	DIG[pS]E[pS]TEDQAMEDIK
11	1951,9527	1	α S1- kazein	YKVPQLEIVPN[pS]AEER
12	2061,8285	1	β - kazein	FQ[pS]EEQQQTEDELQDK
13	2279,0058	1	α S2- kazein	NTMEHVSS[pS]EE[pS]IISQETYK
14	2432,0501	1	β - kazein	IEKFQ[pS]EEQQQTEDELQDK
15	2555,2241	1	β - kazein	FQ[pS]EEQQQTEDELQDKIHPE
16	2720,9130	5	α S1- kazein	QMEAE[pS]I[pS][pS][pS]EEIVPN[pS]VEQK
17	2924,1346	3	α S1- kazein	NTMEHVSS[pS]EE[pS]II[pS]QETYKQEK
18	3025,4413	2	α S2- kazein	FPQ[pY]LQ[pY]LYQGPIVLNPWDQVQR
19	3123,3824	4	β - kazein	RELEELNVPGEIVE[pS]L[pS][pS][pS]EESITR



Şekil 4.19. Pozitif iyon ve lineer mod MALDI kütle spektrumu (A) yağsız inek sütünün triptik parçalanma çözeltisi, (B) demir oksit ile özgün fosfopeptit zenginleşirmesi sonrası desorpsiyon çözeltisi ve (C) özgün fosfopeptit zenginleşirmesi sonrası demir oksit yüzeyi. Numaralar yağsız inek sütü içerisinde bulunan, Tablo 4.2' de verilen fosfopeptitleri göstermektedir.

5. SONUÇLAR

- Fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılabilir en seçici ve adsorpsiyon yeteneği en yüksek metal oksit türü, β -kazein proteininin tripsin enzimi ile parçalanması sonucunda elde edilen peptit çözeltisinin Demir (III), Nikel (II), Zirkonyum (IV), Bakır (II), Talyum (III), Molibden (VI), Çinko (II), Vanadyum (V), Gadolinyum (III), Tantal (V), Dispersiyum (III) oksitleriyle ayrı ayrı muamelesi sonucunda, MALDI-MS analizleri gerçekleştirilerek tespit edilmiştir.
- MALDI-MS ile gerçekleştirilen analizler sonucunda Dispersiyum (III), Gadolinyum (III), Vanadyum (V), Çinko (II) oksitlerinin fosfopeptit adsorpsiyon kapasitesinin çok düşük olduğu belirlenmiş ve bu metal oksit yüzeylerinde fosfopeptit gözlemlenmemiştir.
- Fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında Nikel (II) oksit'in çözelti içerisinde çözünmesi nedeniyle bu metal oksit yüzeyinde fosfopeptit zenginleştirilmesi gerçekleştirilememiş ve MALDI-MS spektrumlarında fosfopeptitlere nikel katılmalarını gösteren sinyaller gözlenmiştir.
- Bakır (II) oksit ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda bu metal oksit türünün fosfopeptitlere karşı gösterdiği seçiciliğin düşük olduğu belirlenmiş ve zenginleştirme sonrası gerçekleştirilen MALDI-MS analizleri sonucunda Bakır (II) oksit yüzeyinde çok sayıda fosfatlanmamış peptit türünün de bulunduğu belirlenmiştir.
- Talyum (III) oksit'in fosfopeptitlere karşı gösterdiği seçiciliğin oldukça yüksek olmasına karşın fosfopeptit adsorpsiyon kapasitesinin düşük olduğu belirlenmiştir.
- Tantal (V) oksit ile gerçekleştirilen çalışmalarda β -kazein içerisinde bulunan fosfopeptitlerden sadece düşük kütleli iki fosfopeptit türünün Tantal (V) oksit yüzeyinde tutunabildiği belirlenmiştir.
- Molibden (VI) oksit ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise yalnızca β -kazein içerisinde bulunan fosfopeptitlerden yüksek kütleli tek bir fosfopeptit türünün Molibden (VI) oksit yüzeyine tutunabildiği belirlenmiştir.
- İncelenen metal oksit türleri içerisinde Demir (III) oksit'in fosfopeptitlere karşı seçiciliği ve adsorpsiyon yeteneği en yüksek metal oksit türü olduğu tespit edilmiştir.

- Fosfopeptitlerin Demir (III) oksit kullanılarak zenginleştirilmesi için en uygun pH değerinin 1,5 olduğu belirlenmiştir.
- Fosfopeptitler, β -kazein proteininin tripsin ile enzimatik parçalanması sonucunda elde edilen peptit karışımından Demir (III) oksit kullanılarak başarıyla ayrılmış ve MALDI-MS ile Demir (III) oksit yüzeyinden direk olarak analiz edilmiştir.
- β -kazein proteininin enzimatik parçalanması sonucunda elde edilen peptit karışımından Demir (III) oksit kullanılarak zenginleştirilen fosfopeptitlerin, Demir (III) oksit yüzeyinden desorpsiyonu için kullanılacak en uygun pH'nın 11,0 olduğu tespit edilmiştir.
- β -kazein proteininin enzimatik parçalanması sonucunda elde edilen peptit karışımından Demir (III) oksit kullanılarak zenginleştirilen fosfopeptitlerin, Demir (III) oksit yüzeyinden direk analizi sonucunda elde edilen MALDI-MS spektrumları, fosfopeptitlerin Demir (III) oksit yüzeyinden desorpsiyonu sonucu elde edilen çözeltinin MALDI-MS spektrumlarıyla karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda desorpsiyon basamağına gerek olmadığı ve zenginleştirilen fosfopeptitlerin direk olarak Demir (III) oksit yüzeyinden aynı hassasiyet ve başarıyla analiz edilebileceği tespit edilmiştir.
- β -kazein'in tripsin ile enzimatik parçalanması sonucunda elde edilen peptit çözeltisi ve BSA proteininin tripsin ile enzimatik parçalanması sonucu elde edilen peptit çözeltisi ile karıştırılmış ve fosfopeptitler bu kompleks karışımdan Demir (III) oksit ile başarıyla ayrıldıktan sonra MALDI-MS ile Demir (III) oksit yüzeyinden direk olarak analiz edilmiştir.
- Fosfopeptitler, yağsız inek sütünün tripsin ile enzimatik parçalanması sonucu elde edilen kompleks çözeltiden, Demir (III) oksit kullanılarak başarıyla zenginleştirilmiştir.
- Yağsız inek sütünün enzimatik parçalanma çözeltisinden Demir (III) oksit kullanılarak zenginleştirilen fosfopeptitler, MALDI-MS ile direk Demir (III) oksit yüzeyinden analiz edilmiştir.
- Yağsız inek sütünün enzimatik parçalanma çözeltisinden Demir (III) oksit kullanılarak zenginleştirilen fosfopeptitlerin Demir (III) oksit yüzeyinden desorpsiyonu pH=11,0'de gerçekleştirilmiş ve elde edilen desorpsiyon çözeltisinde bulunan fosfopeptitler MALDI-MS ile başarıyla tayin edilmiştir.

- Yağsız inek sütünün enzimatik parçalanması sonucu elde edilen çözeltilerden Demir (III) oksit kullanılarak zenginleştirilen fosfopeptitlerin direk Demir (III) oksit yüzeyinden yapılan MALDI-MS analiz sonuçları yüzeyden desorpsiyon sonucu elde edilen çözeltinin MALDI-MS analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmış ve fosfopeptitlerin MALDI-MS analizinin desorpsiyona gerek olmadan direk Demir (III) oksit yüzeyinden başarıyla gerçekleştirilebileceği tespit edilmiştir.

Literatürde bulunan diğer fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında zenginleştirilen fosfopeptitler metal oksit yüzeyinden desorbe edildikten sonra desorpsiyon çözeltisinden kütle spektrometrik olarak analiz edilirken [40] veya zenginleştirme yüzeyi olan metal küreler üzerinden kütle spektrometrik analizleri yapılırken [41], bu tez kapsamında, fosfopeptitler, toz metal oksit yüzeylerinde başarıyla zenginleştirilmiş ve literatürde ilk defa bir fosfopeptit zenginleştirme çalışmasında fosfopeptitlerin MALDI-MS analizinin desorpsiyon basamağına gerek kalmadan kullanılan yüzey üzerinde direk olarak gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Aebersold, R., Godlett, D., Mass spectrometry in proteomics, *Chemical Reviews*, 101, 269-295, **2001**.
- [2] Witze, E.S., Old, W. M., Resing, K. A., Ahn, N. G., mapping protein posttranslational modifications with mass spectrometry, *Nature Methods*, 4, 798-806, **2007**.
- [3] Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. and Williams, K.L., Progress with proteom projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13,19-50, **1995**.
- [4] Dass, C., *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, a John Willey and Sons INC, 290-343, 3, 5, 83 **2007**.
- [5] Liebler, D.C., Introduction to proteomics: tools for new biology, Humana Press, USA, p.1-10, **2002**.
- [6] Walsh, C.T., Garneau-Tsadikova, S., Gatto, G.J., Protein posttranslational modifications, *Agewandte Chemie-international Edition*, 44, 7342-7372, **2005**.
- [7] Wold, F., In vivo chemical modifications of proteins (posttranslational modifications), *Annual Reviews of Biochemistry*, 50, 783-814, **1981**.
- [8] Cass, M.F., The synthesis and evaluation of diazo functionalized solid supports and their application toward the identifivation of phosphorylated proteins, PhD Thesis, Michigan State University, **2009**.
- [9] Hunter, T., Protein kinases and phosphotases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling cell, 80, 225-236, **1995**.
- [10] Kussman, M., Hauser, K., Kissmehl, R., Breed, J., Platter, H., Roepstorff, P., Comparison of in vivo and in vitro phosphorylation of the exocytosis-sensitive protein PP63/parafusin by differential MALDI mass spectrometric peptide mapping, *Biochemistry*, 38, 7780-7790, **1999**.

- [11] Fischer, E.H., Krebs, E.G., Conversion of phosphorylase B to phosphorylase A in muscle extracts, *Jurnal of Biological Chemistry*, 216, 121-132, **1995**.
- [12] Walsh, C.T., Posttranslation modification of proteins, Roberts and Company, 35-36, **2006**.
- [13] Adamczyk, M., Gebler, J.C., Wu, J., Selective analysis of phosphopeptides within a protein mixture by chemical modification, reversible biotinylation and mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15, 1481-1488, **2001**.
- [14] Roitt, I., Male, D., Brostoff, J., Roth, D., *İmmunology*, 7th Edition, London, Masby, Chapter 1, Chapter 6, PP.19-28, **2006**.
- [15] Blume-Jensen, P., Hunter, T., Oncogenic kinase signaling, *Nature*, 411, 355-365, **2001**.
- [16] Cohen, P., İdentification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction, The 1998 Croonian Lecture, *Phil soc. (series B)*, 354, 435-495, **1999**.
- [17] Hoffman, E., Stroobant, V., *Mass spectrometry principals and applications*, Willey, Third Edition, 14, 33, 34, 44 **2007**.
- [18] Karlsson, E.B., The Nobel Prize in Physics, in Levionovilz AW, Ringertz N, eds. *The Nobel Prize: the first 100 years*, İmperial Collage Press and World Scientific Publishing, 31, **2001**.
- [19] Siuzak, G., *The expending role of mass spectrometry*, 2nd Edition, MCC Press, Sandiego, **2006**.
- [20] Gündüz, T., *İnstrumental analiz, kütle spektrometrisi*, 255-75, **1988**.
- [21] Watson, J.T., *Introduction to mass spectrometry*, Lippencott- Raven Publishing, Philedelphia, **1997**.
- [22] Denoyer, E., Vangrienken, R., Adams, F., Natusch, D.F.S., Laser microprobe mass spectrometry, 1. Basic principals and performance characteristics, *Analytical Chemistry*, 54, A26-6, **1982**.
- [23] Hager, J.W., A new linear ion trap mass spectrom, 16, 512, 526, **2002**.

- [24] Makarov, A., Electrostatic axially harmonic orbital trapping; high performance technique of mass analysis, *Analytical Chemistry*, 72, 1156, 1162, **2000**.
- [25] Dempster, A.J., A new method of positive ray analysis, *Physical Reviews*, 11, 316-324, **1918**.
- [26] Nier, A.O., Electron impact mass spectrometry, *Review of Scientific Instruments*, 18, 415, **1947**.
- [27] Munson, M.S., Field, F.H., Chemical ionization mass spectrometry, I. General Introduction, *Journal of The American Society*, 88, 2621, **1966**.
- [28] Karas, M., Bachmann, D. Hillenkamp, F., Influence of the wavelength in high irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules, *Analytical Chemistry*, 57, 2935, 2939, **1985**.
- [29] Paul, W., Steinwedel, H.Z., A new mass spectrometer without a magnetic field, *Natureforsch*, 8a, 448-450, **1953**.
- [30] Strafford, M., Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 60(1), 85, 92, **1984**.
- [31] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., Enstrümental analiz ilkeleri, (çev: Kılıç, e., Köseoğlu, F., Yılmaz, H.), Bilim Yayıncılık, Ankara, 516, 260, **2008**.
- [32] Wittman, Microbial cell factories, 6:6, **2007**.
- [33] Stephens, W.E., A pulsed mass spectrometer with time dispersion, *Physical Reviews*, 69, 691, **1946**.
- [34] De Hoffman, E., Charlette, J., Stroobant, V., Mass spectrometry principals and applications, John Wiley and Sons, Chichester, **1996**.
- [35] Simpson, R.J., Proteins and proteomics: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Ch 8, **2003**.
- [36] Craig, A.G., Hoeger, C.A., Miller, C.L., Goedken, T., Rivier, J.E., Fisher, W.H., Monitoring protein kinase and phosphatase reactions with matrix-assisted laser-desorption ionization mass spectrometry and capillary sone

electrophoresis comparison of the detection efficiency of peptide-phosphopeptide mixtures, *Biological Mass Spectrometry*, 23, 519-528, **1994**.

- [37] Asara, J.M., Allison, J., Enhanced detection of phosphopeptides in matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ammonium salts, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10, 35-44, **1999**.
- [38] Yang, X.F., Wu, H.P., Kabayashi, T., Solara, R.J. Van Breemen, R.B., Enhanced ionization of phosphorylated peptides during MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 76, 1532-1536, **2004**.
- [39] Steen, H., Jeabanathirajah, J.A., Rush, J., Murrice, N., Kirschner, M.W., Phosphorylation analysis by mass spectrometry- myths, facts and the consequences for qualitative and quantitative measurements, *Molecular Cellular Proteomics*, 5, 172-181, **2006**.
- [40] Lee, A., Yang, H., Lim, E. S., Kim, J., Kim, Y., Enrichment of phosphopeptides using bare magnetic particles, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 2561-2564, **2008**.
- [41] Lo, Y. C., Chen, W.Y., Chen, C. T., Chen, C. Y., Rapid enrichment of phosphopeptides from tryptic digestion of proteins using iron oxide nanocomposites of magnetic particles coated with ceria as the concentrating probes, *Journal of Proteome Research*, 6, 887-893, **2007**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Gizem Kaynar

Doğum Yeri : Ankara/Altındağ

Medeni Hali : Bekar

E-posta : gzmkynr@gmail.com

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Fizikokimya Laboratuvarı, 06800, Beytepe Kampüsü, Ankara, Türkiye

Eğitim

Lise : Gölbaşı Anadolu Lisesi

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, İyi

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

Kütle Spektrometrisi, Fosfopeptit Zenginleştirme, Metal Oksitler, Post-translasyonel Modifikasyonlar

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-