

**PROTEOMİKS ÇALIŞMALARINDA FOSFOPEPTİTLERİN  
SPESİFİK OLARAK ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE KÜTLE  
SPEKTROMETRİSİ İLE TAYİNİ İÇİN POLİKATYONİK  
MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF POLYCATIONIC MATERIALS FOR  
SPECIFIC ENRICHMENT AND MASS SPECTROMETRIC  
DETECTION OF PHOSHOPEPTIDES IN PROTEOMIC  
STUDIES**

**HANDE EYVAZOĞLU**

**PROF. DR. BEKİR SALİH**

**Tez Danışmanı**

**DOÇ. DR. ÖMÜR ÇELİKBIÇAK**

**Tez Eş Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

## ÖZET

# PROTEOMİKS ÇALIŞMALARINDA FOSFOPEPTİTLERİN SPESİFİK OLARAK ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE TAYİNİ İÇİN POLİKATYONİK MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ

**Hande EYVAZOĞLU**

**Yüksek Lisans, Kimya Bölümü**

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

**Tez Eş Danışmanı: Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK**

**Haziran 2018, 69 Sayfa**

Fosforilasyon canlı organizmaların hücre döngüleri içerisinde proteinler için en çok karşılaşılan translasyon sonrası modifikasyondur (post-translational modification, PTM) ve kinaz sinyal yollarıyla düzenlenmektedir. Bu sinyal döngüsü esnasında meydana gelen sorunlar genellikle kanser, diyabet, kronik iltihaplı veya nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle, fosforilasyonları tanımlayarak hücre içerisindeki kinaz aktivitesini izlemek amacıyla farklı analitik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Fosforilasyonun tanımlanması bu hastalıkların ardında yatan nedenlerin anlaşılması ve tedavi edici yaklaşımların ortaya koyulabilmesi açısından büyük yarar sağlamaktadır. Protein fosforilasyonlarının tanımlanması amacıyla genellikle kütle spektrometrisi kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisinin birçok avantajına rağmen, ortamda bulunan bol miktardaki fosfatlanmamış peptitlerin varlığında, fosfopeptitlerin tayin edilmesi oldukça zordur. Ayrıca kütle spektrometrik şartlarda fosfopeptitlerin iyonlaşma etkinlikleri, yapılarında bulunan fosfat gruplarının baskınlığı nedeniyle, fosforilasyona uğramamış emsallerine göre oldukça düşüktür. Bu nedenle, fosfoproteomik verilerin başarılı bir şekilde değerlendirilebilmesi için kütle spektrometrik analizler öncesinde fosfopeptitlerin,

içinde buldukları karmaşık ortamdan alınarak saflaştırılmaları amacıyla yüksek seçiciliğe sahip zenginleştirme metotlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, kolay ve ucuz bir yöntem ile polimerik malzemeler sentezlenmiş, bu polimerik malzemelerin MALDI-MS uygulamalarında kullanılacak yüksek seçiciliğe ve etkinliğe sahip olup olmadıkları ve fosfopeptit zenginleştirme uygulamalarındaki performansları incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fosfopeptit, Kütle Spektrometrisi, Fosfoproteomiks, Zenginleştirme, Polimer, Jel

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF POLYCATIONIC MATERIALS FOR SPECIFIC ENRICHMENT AND MASS SPECTROMETRIC DETECTION OF PHOSPHOPEPTIDES IN PROTEOMIC STUDIES**

**Hande EYVAZOĞLU**

**Master's Degree, Department of Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH**

**Co-supervisor: Doç. Dr. Ömür Çelikbıçak**

**June 2018, 69 Pages**

Phosphorylation is the most common post-translational modification and is regulated by kinase signaling pathways. Defects in this pathway may be related to various diseases such as cancer, diabetes, chronic inflammatory diseases or neurodegenerative diseases. Therefore, different analytical approaches have been developed to identify phosphorylation for following kinase activity in cells. The identification of phosphorylation may be helpful to understand the reasons behind disease conditions and in developing new therapeutic approaches. Mass spectrometry is generally used for monitoring changes in protein phosphorylation. However, even with the advantages of mass spectrometry, it is difficult to detect phosphorylated peptides in the presence of high abundance of non-phosphorylated peptides. Furthermore, the ionization efficiencies of phosphorylated peptides are lower than those of their non-phosphorylated counterparts due to the presence of phosphorylated sites on the structure. Thus, the development of highly specific enrichment methods for phosphopeptides for complex mixtures has been necessary prior to their mass spectrometric analysis for the successful evaluation of phosphoproteomics data. Therefore, polymeric gel based materials were synthesized following an easy and inexpensive

process, and their highly specific and efficient phosphopeptide enrichment performance in MALDI-MS applications were investigated in this study.

**Keywords:** Phosphopeptide, Mass Spectrometry, Phosphoproteomics, Enrichment, Polymer, Gel

## TEŞEKKÜR

Bilimsel çalışma dünyasında ufak da olsa bir yer edinmemi sağlayan, zengin donanımıyla beni her zaman çalışmaya teşvik eden laboratuvar olanağını sunan, her türlü bilgi ve deneyimini paylaşan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen hocam Bekir Salih'e minnetlerimi sunar, çok teşekkür ederim.

Salt merakla dayalı araştırma özgürlüğünü tattıran, beyin fırtınalarıyla ufkumu açan, her ihtiyacım olduğunda benimle hiç çekinmeden yorulmadan saatlerini harcayarak deneyimlerini ve yol gösterici fikirlerini paylaşan, karakterime sorgulayıcı ve araştırmacı kimlik kazandırarak ömrüm boyunca iyi ki tanımışım diyeceğim insanlardan biri olan hocam Ömür Çelikkıçak'a çok teşekkür ederim.

Benim tez çalışmamda kullandığım PS-DVB maddelerini sentezi ve temini konusunda yardımcı olan ayrıca laboratuvar olanağı, bilgi ve fikirleriyle de her zaman kapısını açık tutan hocam Cengiz Uzun'a çok teşekkür ederim.

Bana hem hocalık yapan hem de arkadaş olan laboratuvardaki her an'ıma değer katan, özellikle sorumluluk bilinciyle bana örnek olan, dinlemekten ve anlatmaktan keyif aldığım hocam Ülkü Güler Tokat'a teşekkür ederim.

Lisansımın son senesinde beni çalışmalarıyla heveslendiren, araştırma laboratuvarı deneyimime ilk adımımı attığım günlerden itibaren benimle hiç çekinmeden çalışmalarını deneyimlerini paylaşan yardımsever hocam Mehmet Atakay'a çok teşekkür ederim.

En yoğun zamanlarımızı birlikte paylaştığımız, gülüp eğlenerek laboratuvardaki her anıma keyif katan, yardımsever ve destekçi kapılarını her daim açık tutan tertemiz kalpli canım arkadaşım Canan Höçük'e çok teşekkür ederim.

Çalışmaların en yorucu ve bazen bunaltıcı adımların atarken bile hoş sohbetleriyle enerji katan, destek olan Hacı Mehmet Kayılı, Burak Tavşanlı, Selim Gerişlioğlu, Ayşegül Özgen, Aslı Çal'a çok teşekkür ederim.

Her kararına saygı duyan destekleyen, maddi-manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, var olmamı onların varlıklarına borçlu olduğum ve bu hayatta sahip olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim canım ailem, babam Bülent Kabadayı, annem Hadiye Kabadayı, abim Hamdi Kabadayı ve kardeşim Burak Kabadayı'ya çok teşekkür ederim.

Fikirleri ve farklı bakış açısıyla bana her zaman hayatın farklı bir yanını gösteren, sakinliğiyle sakinleştiren, sevgisiyle dünyamı ısıtan, bu hayatta onunla hayat yoldaşı olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim biricik eşim Oğuz Eyvazoğu'na çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
TABLolar DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Proteinler .....	4
2.1.1. Amino Asitler .....	4
2.1.2. Peptitler .....	5
2.2. Proteomik .....	7
2.2.1. Post-translasyonel Modifikasyonlar (PTM) .....	8
2.2.2. Proteomik ve Kütle Spektrometrisi .....	11
2.3. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ .....	11
2.3.1. Genel Prensip .....	13
2.3.2. Kütle Spektrometresi Bileşenleri .....	14
2.2.3. Tandem Kütle Spektrometresi .....	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	22
3.1. Amin Fonksiyonel Gruplu Polimer Malzemelerin Sentezi .....	22
3.1.1. Poli(NH-AT) hidrojellerinin sentezi .....	22
3.1.2. Amin Fonksiyonel Grupları bağlanmış Poli(stiren-ko-divinilbenzen) mikrokürelerin (NH <sub>2</sub> -PSDVB-MB) Sentezi .....	22
3.1.3. Amin Fonksiyonel Grupları Bağlanmış Düz Zincirli Poli(stiren-ko- divinilbenzen) (NH <sub>2</sub> -PSDVB) Sentezi .....	24
3.2. Proteinlerin enzimatik parçalanması .....	24
3.3. Zenginleştirme Yöntemi .....	24
3.3.1. Adsorpsiyon Basamağı .....	24
3.3.2. Desorpsiyon ve Elüsyon Basamağı .....	25
3.4. MALDI Kütle Spektrometresi Analizleri .....	25
4. TARTIŞMA VE YORUM .....	27

4.1. $\beta$ -kazein enzimatik parçalanma ürünleri içerisinde yer alan fosfopeptitlerin Poli(NH-AT) hidrojeller kullanılarak zenginleştirilmesi .....	33
4.2. Farklı oranlarda 1-allil-2-tiyöre (AT) içeren hidrojellerin fosfopeptit zenginleştirmesindeki etkinliklerinin incelenmesi.....	35
4.3. İnek sütünün tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen peptit çözeltisinden, fosfopeptitlerin Poli(NH-AT) hidrojeller kullanılarak zenginleştirilmesi .....	36
4.4. İnek sütünün tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen peptit çözeltisinden, fosfopeptitlerin Poli(NH-AT) hidrojeller doldurularak hazırlanmış pipet ucu kullanılarak zenginleştirilmesi .....	38
4.5. $\beta$ -kazein enzimatik parçalanma ürünleri içerisinde yer alan fosfopeptitlerin amin fonksiyonel gruplarıyla modifiye edilmiş $\text{NH}_2$ -PSDVB kullanılarak zenginleştirilmesi .....	40
4.6. $\beta$ -kazein enzimatik parçalanma ürünleri içerisinde yer alan fosfopeptitlerin amin fonksiyonel gruplarıyla modifiye edilmiş $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB kullanılarak zenginleştirilmesi .....	42
4.7. $\text{NH}_2$ -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında desorpsiyon süresinin zenginleştirmeye etkisi.....	44
4.8. $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında desorpsiyon süresinin zenginleştirmeye etkisi.....	46
4.9. $\text{NH}_2$ -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında desorpsiyon aşamasında kullanılan asetonitril miktarının zenginleştirmeye etkisi .....	48
3.10. $\text{NH}_2$ -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında uygulanan yıkama basamaklarının etkinliğinin MALDI-MS ile incelenmesi .....	50
4.11. $\text{NH}_2$ -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında $\beta$ -kazein derişiminin zenginleştirme performansına etkisi .....	52
4.12. $\text{NH}_2$ -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında zenginleştirme öncesinde $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisine karıştırılan BSA peptit çözeltisinin etkisinin incelenmesi .....	54
4.13. $\text{NH}_2$ -PSDVB ve $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB ile sadece BSA peptit çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışması .....	56



4.14. NH <sub>2</sub> -PSDVB ve NH <sub>2</sub> -PSDVB-MB polimerleri kullanılarak fosfopeptitlerin doğrudan süt içerisinden zenginleştirilmesi .....	57
5. SONUÇLAR .....	61
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	69

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Amino asitler.....	4
Tablo 2. Birleşik proteinler ve prostetik grupları.....	6
Tablo 3. İyon Kaynakları.....	14
Tablo 4. Bazı yaygın UV-MALDI matriksleri .....	16
Tablo 5. Kütle spektrometresinde kullanılan kütle ayırıcı türleri ve ayırma prensipleri.....	18

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Amino asit genel yapısı .....	4
Şekil 2. Peptit bağı şematik gösterimi .....	5
Şekil 3. Proteinin yapı çeşitleri.....	7
Şekil 4. Bazı Post-translasyonel modifikasyonlar[10] .....	9
Şekil 5. Fosfozerin, fosfotreonin, ve fosfotirozin aminoasitlerinin kimyasal yapısı .....	9
Şekil 6. Serin aminoasidinin fosforilasyonu .....	10
Şekil 7. Fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonlarının şematik gösterimi .....	10
Şekil 8. İzobütan kütle spektrumu .....	12
Şekil 9. [12].....	12
Şekil 10. Kütle spektrometresi bileşenlerinin şematik gösterimi.....	13
Şekil 11. MALDI iyonlaşma prensibi şematik gösterimi.....	16
Şekil 12. Ayırma gücünün spektrum üzerinde gösterilmesi.....	18
Şekil 13. MALDI-TOF şematik gösterimi.....	20
Şekil 14. (Poli(N-hidroksimetil)metakrilamit-alliltiyoüre) sentez mekanizması .....	22
Şekil 15. Poli(stiren-divinilbenzen)(PSDVB) bileşiği kimyasal yapısı .....	23
Şekil 16. Poli(stiren-ko-divinilbenzen) Sentezi.....	23
Şekil 17. $\beta$ -kazein'in SA matriksi kullanılarak elde edilmiş pozitif iyon mod MALDI kütle spektrumu.....	32
Şekil 18. $\beta$ -kazein ve BSA proteinlerinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltilerinin karışımlarının (A) MALDI kütle spektrumu. (B) aynı karışım çözeltisinin Poli(NH-AT) hidrojelleriyle muamele edildikten sonra desorpsiyon çözeltisinin kütle spektrumu.....	34
Şekil 19. $\beta$ -kazein ve BSA proteinlerinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltilerinin karışımlarının farklı oranlarda allil-2-tiyoüre (AT) içeren poli(NH-AT) hidrojelleriyle muamele edilmesi sonrasında elde edilen desorpsiyon çözeltilerinin kütle spektrumu (A) %2.5, (B) %5, (C) %7.5, (D) %10 AT içeren hidrojeldir.....	35
Şekil 20. İnek sütünün tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen çözeltinin (A) Zenginleştirme öncesi MALDI kütle spektrumu (B) Poli(NH-AT) hidrojeni kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilmiş MALDI kütle spektrumu. 37	
Şekil 21. İnek sütünün tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen çözeltinin (A) Zenginleştirme öncesi MALDI kütle spektrumu (B) Poli(NH-AT) hidrojeni doldurulmuş pipet ucuyla gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilmiş MALDI kütle spektrumu.....	39
Şekil 22. (A) $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltinin MALDI kütle spektrumu. (B) $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından NH <sub>2</sub> -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumu.....	41
Şekil 23. (A) $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltinin MALDI kütle spektrumu. (B) $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından NH <sub>2</sub> -PSDVB-MB kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumu.....	43
Şekil 24. $\beta$ -kazein peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından NH <sub>2</sub> -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumu. (A) desorpsiyon süresi 0 dk. (B)desorpsiyon süresi 30 dk.....	45

Şekil 25. $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından NH <sub>2</sub> -PSDVB-MB kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumu. (A) desorpsiyon süresi 0 dk. (B)desorpsiyon süresi 30 dk.....	47
Şekil 26. $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından NH <sub>2</sub> -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirmenin adsorpsiyon basamağında (A) 10 $\mu$ Lasetonitril eklenmesi (B) 70 $\mu$ Lasetonitril eklenmesi sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumları.....	49
Şekil 27. (A) $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltisinin (zenginleştirme öncesi) MALDI kütle spektrumu (B) Zenginleştirme basamağında malzemenin adsorpsiyon sonrası 1. Yıkama çözeltisinin MALDI kütle spektrumu (C) Zenginleştirme basamağında malzemenin adsorpsiyon sonrası 3. Yıkama çözeltisinin MALDI kütle spektrumu (D) Desorpsiyon işlemi sonrasında elde edilen çözeltinin MALDI kütle spektrumu. ....	51
Şekil 28. $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltisinin NH <sub>2</sub> -PSDVB ile zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumu (A) 5.39 femtomol/ $\mu$ L derişime sahip $\beta$ -kazein (B) 0.539 femtomol/ $\mu$ L derişime sahip $\beta$ -kazein .....	53
Şekil 29. $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltisinin NH <sub>2</sub> -PSDVB ile zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumu (A) BSA peptit çözeltisiyle karıştırılmadan yapılan zenginleştirme (B) BSA peptit çözeltisiyle karıştırıldıktan sonra yapılan zenginleştirme sonrası MALDI kütle spektrumları .....	55
Şekil 30 BSA peptitlerininNH <sub>2</sub> -PSDVB malzemesiyle zenginleştirilmesi sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrumu.....	56
Şekil 31. BSA peptitlerinin NH <sub>2</sub> -PSDVB-MB malzemesiyle zenginleştirilmesi sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrumu.....	57
Şekil 32. (A) İnek sütünün tripsinle parçalanma ürünlerini içeren çözeltinin MALDI kütle spektrumu. (B) Süte ait peptit çözeltisinin NH <sub>2</sub> -PSDVB malzemesiyle zenginleştirilmesi sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrumu .....	58
Şekil 33. (A) İnek sütünün tripsinle parçalanma ürünlerini içeren çözeltinin MALDI kütle spektrumu. (B) Süte ait peptit çözeltisinin NH <sub>2</sub> -PSDVB-MB malzemesiyle zenginleştirilmesi sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrumu. ....	60

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	derece santigrad
µl	mikrolitre
ml	mililitre
g	gram
mg	miligram
mM	milimolar
α	alfa
β	beta
γ	gamma
κ	kappa

### Kısaltmalar

MALDI	Matriks yardımcı lazer desorpsiyonlu iyonlaşma
ESI	Elektrosprey iyonlaşma
G	Gibbs serbest enerjisi
PTM	Post-translansyonel modifikasyon
ATP	Adenozin trifosfat
NMR	Nükleer manyetik rezonans
TOF	Uçuş zamanlı
GC-MS	Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
MALDI-TOF-MS	Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaşmalı uçuş zamanlı kütle spektrometresi
FD	Alan iyonlaşma
FAB	Hızlı atom bombardımanı
UV	Ultraviyole
R	Ayırma gücü
PVC	Polivinilklorür
ATU	Allitiyoüre
BSA	Sığır serum albümin
PSDVB	Polistirendivinilbenzen

NH <sub>2</sub> -PSDVB	Düz zincir yapıda olan ve amin fonksiyonel grup içeren polistirendivinilbenzen
NH <sub>2</sub> -PSDVB-MB	Mikroküre yapısında olan ve amin fonksiyonel grup içeren polistirendivinilbenzen

# 1. GİRİŞ

Hücrede gerçekleşen biyolojik faaliyetlerin pek çoğu proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları aracılığı ile yönetilir. [1] Protein ve peptitler hücre içinde farklı zamanlarda farklı modifikasyonlara uğrayarak çeşitli fonksiyonlar kazanırlar. Hücresel faaliyetler sırasında protein yapılarında yüzlerce farklı türde kovalent modifikasyonun meydana geldiği bilinmektedir [2]. Bu post-translasyonel modifikasyonlar fosfat, alkil, açıl gibi bazı kimyasal grupların protein yapısındaki bir ya da daha fazla sayıda amino asit'e tersinir ve kovalent olarak bağlanması ile gerçekleşir.

En sık rastlanan ve üzerinde en çok çalışma yapılan modifikasyon yapıya tersinir olarak fosfat grubunun bağlanması yani fosforilasyondur [3]. Protein fosforilasyonu, kinaz ve fosfataz enzimlerinin karşılıklı olarak çalışmalarıyla düzenlenen hücresel bir olaydır. Hücresel proteinlerin % 30'una yakını farklı zamanlar ve fonksiyonlar dahilinde fosfatlanmış durumda bulunmaktadır. Hücrelerde görev alan çoğu enzim ve reseptör birimleri, yapılarında meydana gelen fosforilasyon veya defosforilasyon ile belirli bir fonksiyon için aktif veya inaktif duruma geçmektedir. Hücre içi sinyal iletim mekanizmalarında fosforilasyon-defosforilasyon olaylarının önemli ölçüde yer aldıkları dikkate alındığında bu gibi olaylarda meydana gelebilecek herhangi bir bozunma, kanser [3], tip-II diyabet [2], kistikfibrozis [4] ve Alzheimer [5] gibi hücresel faaliyet bozukluklarından kaynaklanan hastalıkların oluşumlarıyla ilişkilendirilebilir.

Fosforilasyona uğramış proteinlerin karmaşık örnekler içerisinde tanımlanmaları ve bu protein zincirlerinde yer alan fosfatlanmış aminoasitlerin yerlerinin tayin edilmesi, hücre içinde meydana gelen yaşamsal faaliyetlerle ilgili yararlı bilgilerin elde edilmesi ve pek çok hastalığın teşhisi ve tedavisi açısından oldukça önemlidir [6]. Fosforilasyonun hücre fonksiyonları üzerine etkisi nedeniyle, yaklaşık son yirmi yılda fosfoproteinler ve kinazlar üzerine yapılan araştırmalarla bahsedilen hastalıkların ve bozuklukların teşhis edilmeleri için biyoizleyicilerin (biomarkers) ve tedavileri amaçlı muhtemel ilaçların geliştirilmesi için çaba sarf edilmektedir [7].

İnsan proteomunda fosfoproteinlere aynı zamanda farklı hücresel bölgelerde rastlanılabilir, fakat bu tür proteinlerin hücre içerisindeki miktarları diğer proteinlere

göre oldukça azdır. Hücrede bulunan tüm proteinlerin yalnızca yüzde birkaçı fosfatlanmış haldedir [6]. Protein ve peptit analizlerinde kütle spektrometrik tekniklerin kullanılmaya başlanması ardından fosfoproteomiks alanında da çok daha hızlı ve etkili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır [8]. Biyomolekül analizlerindeki asıl ilerleme, matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) ve elektrosprey iyonlaştırma (Electrospray Ionization, ESI) yöntemlerinin geliştirilmeleri ile gerçekleşmiştir. Bunlar gibi yumuşak iyonlaştırma yöntemleri, büyük biyomoleküllerin parçalanmadan, gaz fazına geçirilebilmelerine olanak sağlayarak, kütle spektrometrik tekniklerle analiz edilmelerini mümkün hale getirmiştir. Kütle spektrometrisi yaygınlaşmadan önce araştırmacılar, fosfoprotein tespit ve analiz çalışmalarında farklı yöntemler kullanmaktaydılar. <sup>32</sup>P işaretleme, jel elektroforez, Edman yöntemi, fosfospesifik antikorların kullanılması gibi yöntemler bunlardan birkaçıdır [6]. Ancak bu yöntemlerin uygulamalarının pratik olmamalarının yanı sıra hassasiyetlerinin de düşük olması, kütle spektrometrisini fosfoproteomiks çalışmaları için en ideal analitik yöntem durumuna getirmektedir.

Ancak fosfoproteinlerin miktarının ortamda bulunan fosfat grubu içermeyen proteinlere kıyasla çok düşük olması, buldukları biyolojik ortamın çok karmaşık olması ve kütle spektrometrik analizlerde iyonlaşma verimlerinin diğer protein ve peptitlere kıyasla düşük olması nedeniyle fosfopeptitlerin tayinleri oldukça zordur. Dolayısıyla fosfopeptitlerin buldukları ortamdaki seçimli olarak ayrılması ve zenginleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla fosfopeptitlerin zenginleştirilmesinde kovalent bağlanmaya veya kovalent olmayan etkileşimlere dayalı farklı yöntemler ve malzemeler kullanılmaktadır. Bu çalışmalar genellikle metal-fosfopeptit, fonksiyonelize polimer-fosfopeptit veya fonksiyonelize sol-jel-fosfopeptit ya da iyon değiştirici reçineler ile yük ayırımına dayanarak gerçekleştirilmektedir.

Bu tez kapsamında öncelikle fosfoprotein ya da fosfopeptitlerin kütle spektrometrik analizleri için uygun ortam koşulları belirlenmiştir ve bu fosfopeptitlerin kütle spektrometrik analizlerinde molekülün parçalanmadan intakt olarak iyonlaşmasını sağlayabilen matriks yardımlı-lazer desorpsiyon iyonlaştırma (MALDI) ve elektrosprey iyonlaştırma (ESI) yöntemleri kullanılmıştır.

Fosfopeptitlerin zenginleştirilebilmeleri için polikasyonik özellik gösteren amin fonksiyonel grupta 3 farklı malzeme üretilerek zenginleştirme işlemi denenmiş,



farklı ortam koşullarında bu malzemelerin etkinlikleri tartışılmış ve zenginleştirmenin daha hızlı ve verimli bir şekilde yapılabilmesi için yeni analitik metotlar geliştirilmiştir.

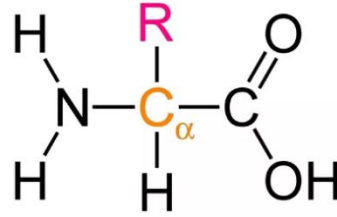
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Proteinler

Proteinler amino asitlerin birbirlerine peptit bağları vasıtasıyla bağlanmasıyla oluşan yapılardır. Ribozom tarafından üretilirler ve 20 çeşit amino asitin farklı sayılarda farklı kombinasyonlarla birbirine kovalent bağlanmasıyla çok çeşitli protein yapıları oluşur. Proteinler temelde karbon (C), hidrojen (H), azot (N) ve kükürt (S) içermek üzere, beraberinde fosfor (P), demir (Fe), çinko (Zn) elementleri de bulunabilir. 20 amino asitin farklı kombinasyonlar ve diziler halinde birleşmesiyle hormonlar, enzimler, antikorlar, süt proteinleri, kaslar gibi pek çok farklı biyolojik aktiviteye sahip yapılar oluşur.

#### 2.1.1. Amino Asitler

Amino asitler aynı karbon atomuna bağlı bir karboksil grubu, bir amino grubuna sahiptir. Bu grupların bağlı olduğu merkez karbon alfa karbon ( $\alpha$ -karbon) olarak ve devam eden diğer karbonlar da merkezden uzaklaştıkça sırasıyla  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  karbonlar olarak adlandırılır R grubu ise her aminoasitte farklıdır.



Şekil 1. Amino asit genel yapısı

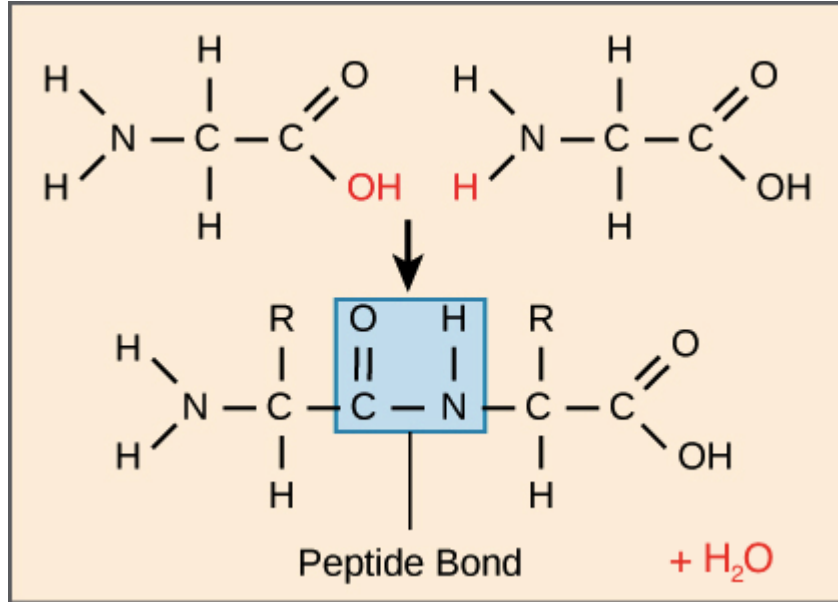
Tablo 1. Amino asitler

No	Amino Asit	Molekül Ağırlığı (gr/mol)	Sembolü
1	Alanin	89	Ala
2	Arjinin	174	Arg
3	Asparagin	132	Asn
4	Aspartik asit	133	Asp
5	Fenil alanin	165	Phe
6	Glutamin	146	Gln
7	Glutamik asit	147	Glu
8	Glisin	75	Gly
9	Histidin	144	His
10	İzolüzin	131	Ile
11	Lüzin	131	Leu
12	Lizin	146	Lys

13	Metionin	149	Met
14	Prolin	115	Pro
15	Serin	105	Ser
16	Sistein	121	Cys
17	Treonin	119	Thr
18	Triptofan	204	Trp
19	Tirozin	181	Tyr
20	Valin	171	Val

### 2.1.2. Peptitler

İki amino asit molekülü kondenzasyon (katılma) reaksiyonuyla bir peptit bağı oluşturarak bağlanabilir.



Şekil 2. Peptit bağı şematik gösterimi

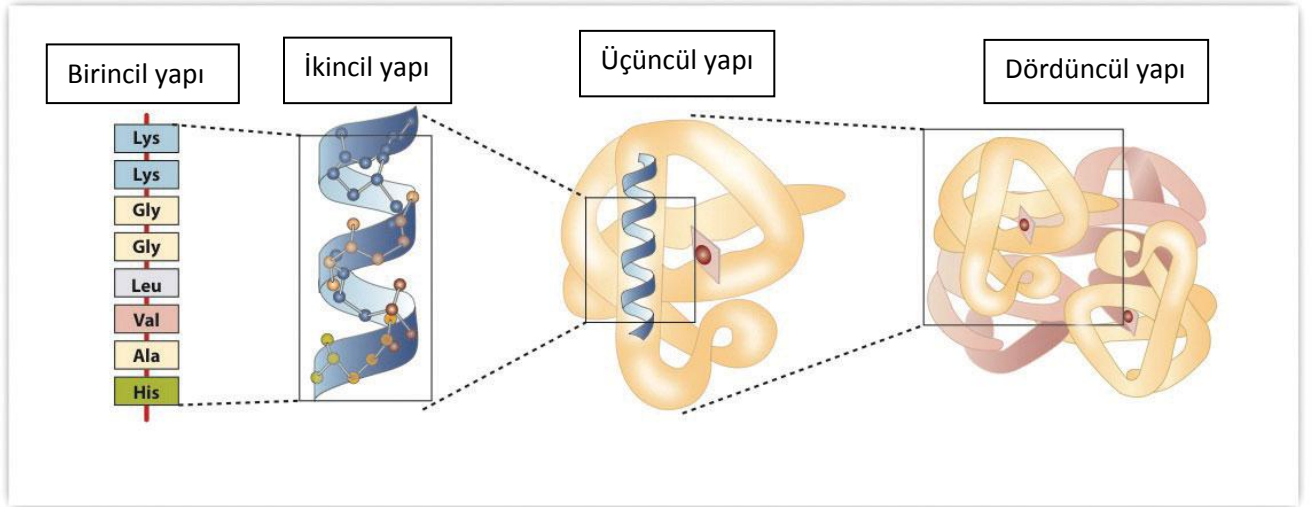
Peptit bağı oluşumu sırasında  $\alpha$ -karboksil ve  $\alpha$ -amino gruplarından gelen  $\text{OH}^-$  ve  $\text{H}^+$  grupları birleşerek bir molekül su açığa çıkmasına sebep olurlar. İki aminositin bir araya gelmesiyle oluşan yapıya dipeptit, üç aminoasitin bir araya gelmesiyle oluşan yapıya tripeptit denir ve sayı arttıkça tetrapeptit, pentapeptit olarak devam eder. Bu şekilde az sayıda aminoasit içeren yapılara genel olarak oligopeptit, çok sayıda amino asitin bir araya gelmesiyle oluşan yapılara da polipeptitler denir. Proteinler ise polipeptitlerle aynı anlamda da kullanılabilirdiği gibi aslında genel olarak kütlesi 10000 Da üzerinde olan moleküllerdir. Proteinler her bir amino asit eşit sayıda içermek zorunda değildir. Bir amino asit bir protein çok sayıda diğeri az sayıda içerebilir, hatta hiç içermeyebilir. İçeriğindeki amino asit tipleri ve sayıları tamamen o proteine özgüdür. Ayrıca bazı proteinler kalıcı olarak aminoasitler

dışında kimyasal gruplar da içerebilirler. Bunlara konjuge (birleşik) proteinler denir. Konjuge proteinin amino asit dışında kalan kimyasal grubuna prostetik grup denir. Tüm içeriğindeki bu amino asit tipleri, sırası ve içeriğindeki diğer kimyasal gruplar proteinlerin kendilerine özgün olmasını sağlarlar ve çeşitli biyolojik işlevler kazandırır [9].

Tablo 2. Birleşik proteinler ve prostetik grupları [9]

Sınıf	Prostetik Grup	Örnek
Lipoproteinler	Lipitler	Kandaki $\beta$ 1-lipoprotein
Glikoproteinler	Karbonhidratlar	İmmünglobulin G
Fosfoproteinler	Fosfat Grupları	Sütteki kazein
Hemoproteinler	Hem (demir porfirin)	Hemoglobin
Metalloproteinler	Flavin nükleotitleri	Süksinat dehidrogenaz
	Demir	Ferritin
	Çinko	Alkol Dehidrogenaz
	Kalsiyum	Kalmodulin
	Molibden	Dinitrogenaz
	Bakır	Plastosiyenin

Proteinler yapısal olarak dört düzeyde tanımlanır. Kovalent bağlarla bağlanmış polipeptit zincir yapısal modeli birincil yapı, amino asit kalıntılarının daha kararlı düzenlemelerle tekrarlayan yapısal modeli ikincil yapı, polipeptitin 3 boyutlu katlanmalarını gösteren yapısal modeli üçüncül yapı, iki ya da daha fazla polipeptit alt birimleri içeren ve uzaysal düzenini de gösteren yapısal modele de dördüncül yapı denir. Birincil yapıda sadece peptit bağlarıyla dizilimlenmiş amino asitler bulunurken ikincil yapıda disülfid bağları ve hidrojen bağları da oluşmuştur ve bu sayede ikincil yapıda  $\alpha$ -heliks yapısı,  $\beta$  kıvrılmaları ya da rastgele (random) kıvrılmalar görülür. Üçüncül (tersiyer) yapılar  $\alpha$ -heliks yapısı ve kıvrılmış yapıların üst üste katlanmaları ya da kendi etraflarında dönmeleri sonucu oluşur.



Şekil 3. Proteinin yapı çeşitleri

Bir proteinin yapısında bulunan atomların uzaysal konumlanması proteinlerin konformasyonu olarak adlandırılır. Birincil yapıda tanımlanan kovalent bağlar bozulmaksızın bağ etrafındaki rotasyonlarla olası pek çok konformasyonu mümkündür. Bir protein çoğunlukla termodinamik olarak en kararlı yani en düşük Gibbs serbest enerjisine (G) sahip konformasyon almaya çalışır. Protein yapısını oluşturan kovalent ve kovalent olmayan bağlar aşağıdaki gibidir;

- Kovalent bağlar: Peptit bağları ve disülfid bağları
- Kovalent olmayan bağlar: Hidrojen bağları, iyonik bağlar, apolar bağlar

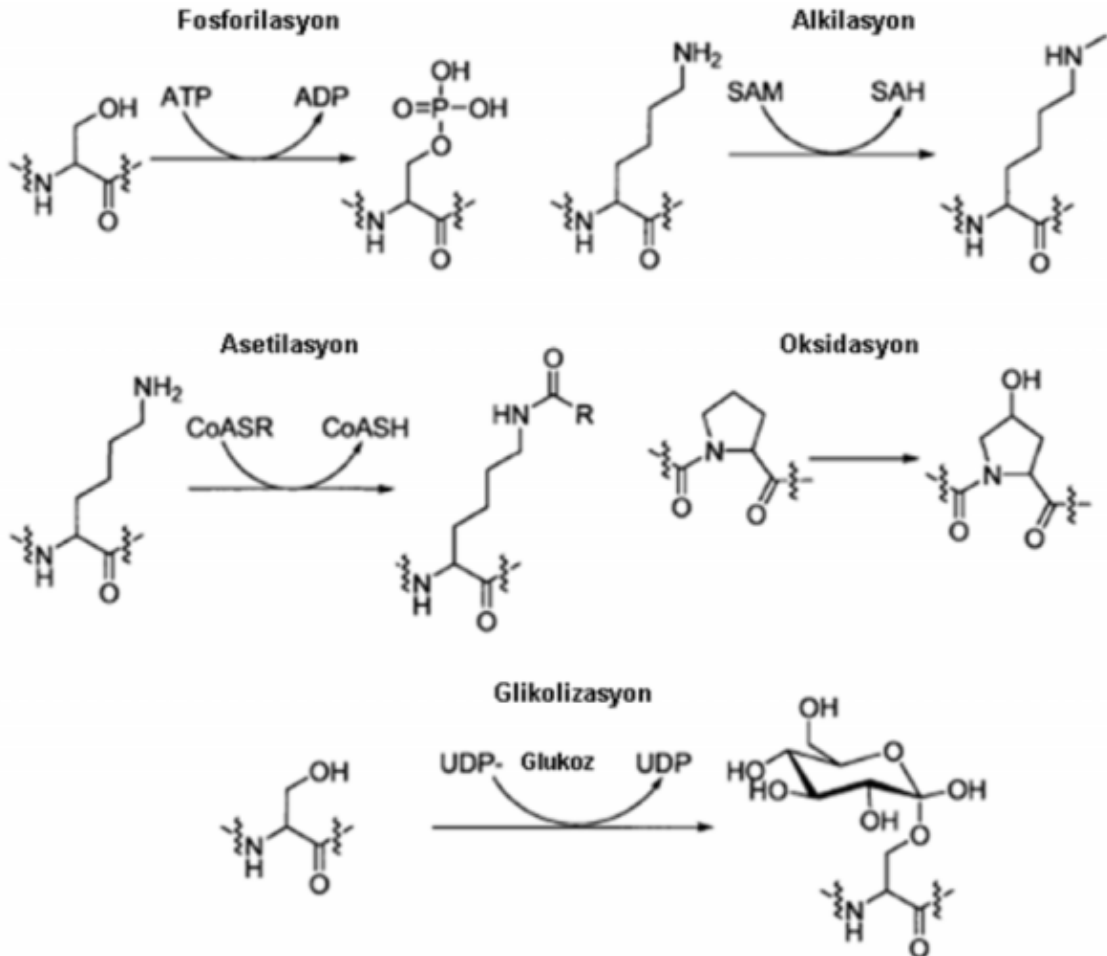
## 2.2. Proteomik

Proteom terimi protein ve genom sözcüklerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Bu terimler ilk kez 1995 yılında bilim adamı Wilkins ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır. Proteomik yani proteom analizi ise belirli bir anda belirli bir ortamda bulunan tüm proteinlerin yapılarını, fonksiyonlarını, birbirleriyle ve buldukları ortamla ilişkilerini, yapılarında meydana gelen değişikliklerini inceleyen çalışma alanıdır [10]. Yani proteomik çalışmaları protein biyokimyası çalışmalarından daha karmaşık olduğu söylenebilir. Protein biyokimyası çalışmalarında tek bir proteine odaklanılır ve bu protein yapısal olarak incelenir, proteomik çalışmaları ise kompleks karışımlar yani çoklu protein sistemleri komple merceğe altına alınır, karışım içindeki tüm proteinler, proteinlerin yapılarındaki anlık değişimler yani post-translasyonel modifikasyonları ve

birbirleriyle etkileşimleri incelenir. Kısacası proteomikte amaç yapısal analiz değil sistemin davranışını karakterize etmektir.

### 2.2.1. Post-translasyonel Modifikasyonlar (PTM)

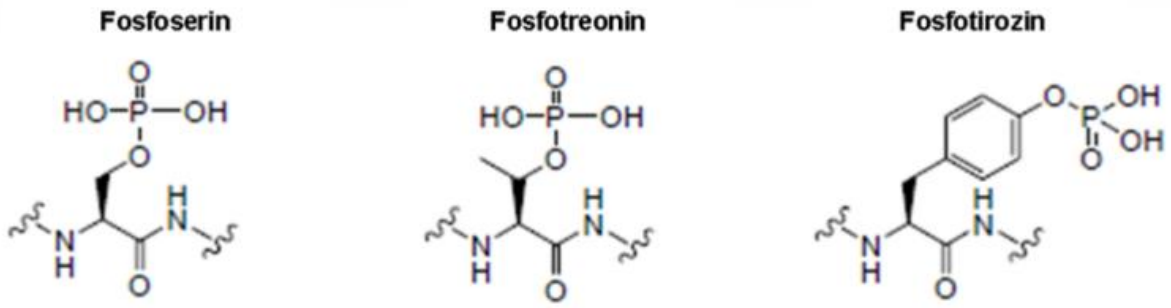
Hücredeki yaşamsal faaliyetler proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları sayesinde gerçekleştirilirler [11]. Bu modifikasyonlara protein yapısına fosfat, metil, karbonhidrat, lipid gibi yapıların kovalent olarak bağlanması örnek olarak verilebilir. Modifikasyon tipine göre asetilasyon, glikolizasyon, fosforilasyon gibi isimler alan 300 farklı modifikasyonun varlığı bilinmektedir. Bu reaksiyonlar şekil 4'te verilen bazı örneklerde de olduğu gibi çeşitli kofaktörlerin yardımıyla gerçekleşir. PTM olarak adlandırılan Post-translasyonel modifikasyonlar genellikle tersinir yani geri dönüşümlüdür [12]. Modifiye olan kimyasal gruplar amino asitlerin özelliklerini değiştirerek bazı fonksiyonlar kazanmasını sağlarlar, bir süre sonra sistem içindeki görevleri tamamlanmasının ardından da amino asit yapılarından ayrılırlar. PTM'ler arasında en sık görülenlerden biri fosforilasyon sayılabilir [13].



Şekil 4. Bazı Post-translasyonel modifikasyonlar [14]

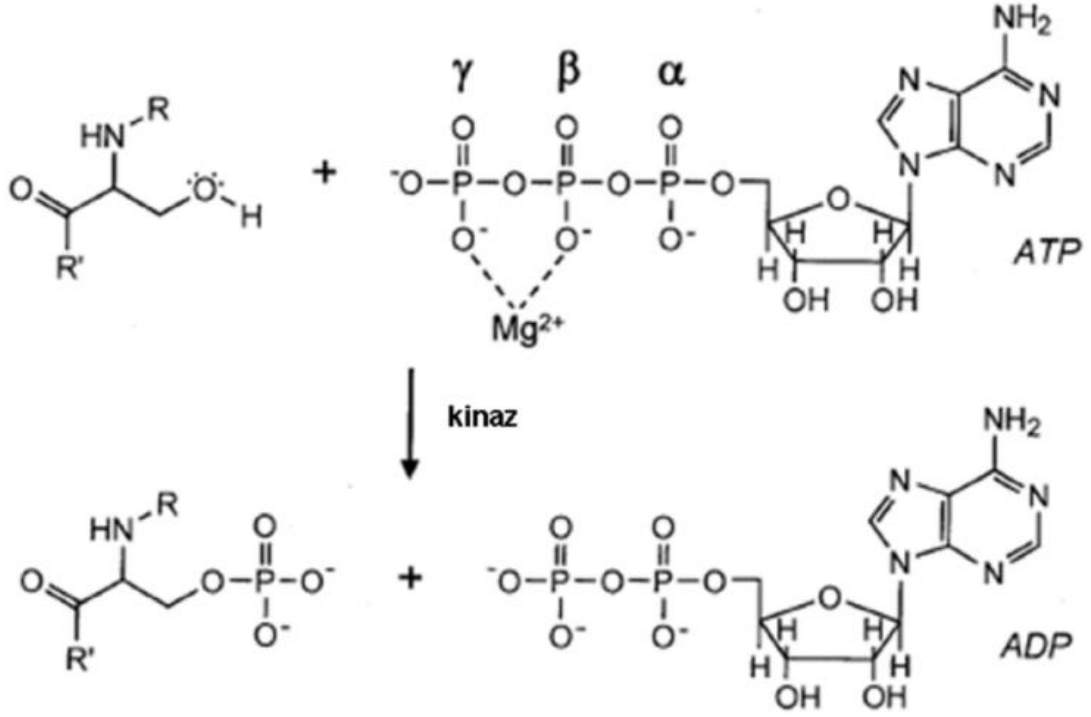
### 2.2.1.1. Fosforilasyon

Fosforilasyon bir protein ya da daha küçük bir moleküle fosfat grubunun kovalent olarak bağlanması şeklinde tanımlanabilir. Hücrelerdeki proteinlerin farklı anlarda ve yerlerde yaklaşık %30'unun fosfatlanmış halde bulunduğu tespit edilmiştir. [3] 1992 yılında Edmond H., Fischer ve Ewin G. Krebs'in iki değerli metal iyonu varlığında glikojen fosforilazın aktif formunu inaktif formuna dönüştürmesiyle Nobel ödülünü almasının ardından fosfoproteomik çalışmalarının önemi daha çok anlaşılmış ve daha çok ilgi görmeye, araştırılmaya başlamıştır.

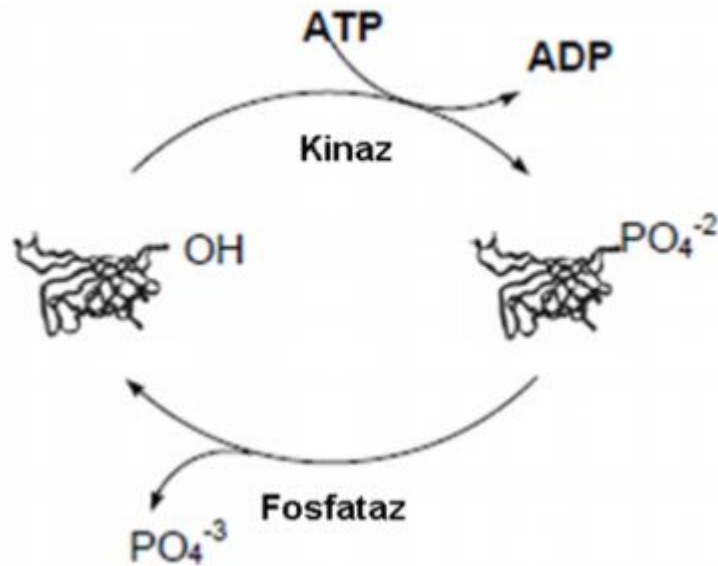


Şekil 5. Fosfoserin, fosfotreonin, ve fosfotirozin aminoasitlerinin kimyasal yapısı

Memeli hücrelerinde büyük bir çoğunlukla serin ve treonin aminoasitleri fosfatlanır, bu sıralamayı küçük bir oran ile tirozin takip eder [15]. Bu aminoasitlerin fosfatlanmış kimyasal yapıları şekil 5'te verilmiştir. Adenozin trifosfat (ATP) kinaz enzimi varlığında fosfat verici olarak görev yapar [16]. Fosfat transferinde serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin yan zincirlerindeki hidroksil grupları rol oynarlar. ATP gama fosfat grubunu kaybederken adenozin difosfat'a dönüşür ve protein molekülüne de bir fosfat grubu bağlanır. Fosfat grubu deprotone ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ise protein molekülünün ağırlığı 78 Da kadar, tamamen protene ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) ise de 80 Da kadar artar. Şekil 6'da ve Şekil 7'de de görüldüğü gibi fosforilasyon sürecini katalizleyen kinaz proteini, defosforilasyon olayını katalizleyen ise fosfataz proteinleridir [17].



Şekil 6. Serin aminoasidinin fosforilasyonu



Şekil 7. Fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonlarının şematik gösterimi

Çoğu hücre içi sinyal iletimi bu fosforilasyon-defosforilasyon olayı sayesinde gerçekleşir. Dolayısıyla fosforilasyon-defosforilasyon olaylarında



gerçekleşebilecek herhangi bir bozunma kanser, tip 2 diyabet, kistik fibrozis ve alzheimer gibi hastalıkların oluşması ile ilişkilendirilebilir [18]. Bu hastalıkların teşhis ve tedavisi için fosfopeptitlerin analiz edilmesi büyük önem taşımaktadır. Ancak fosfopeptitlerin analizleri bazı sebeplerden dolayı kolay yapılamamaktadır. Bu sebepler şu şekilde açıklanabilir; hücre içerisinde var olan tüm proteinler düşünüldüğünde bunlardan yalnızca ufak bir kısmı fosfatlanmaya müsait olması yani miktar olarak çok az olmaları ve de tek bir protein yapısının farklı bölgelerinden fosfatlanabilme kabiliyetine sahip olması yani aynı proteinin farklı aminoasitlerinden fosfatlanmış hallerinin mevcut olması. Ayrıca fosfopeptitlerin buldukları ortamdaki miktarı analitik yöntemlerin de gözlenebilme sınırlarının altında kalmaktadır. Bununla beraber fosfatlanma tersinir bir olay olduğu için hedeflenen molekül henüz analiz edilemeden fosfat grubunu kaybetme riski de vardır [15]. Tüm bu sebeplerden dolayı fosfopeptit çalışmalarında öncelikle zenginleştirme işlemi yapılarak zenginleştirilmiş karışım içerisinde analiz edilmektedir [19]. Ön zenginleştirme işlemi sayesinde ortamdaki fosfatlanmamış proteinler uzaklaştırılarak fosfatlanmış proteinlerin piklerini baskılaması önlenmiş olur.

### **2.2.2. Proteomik ve Kütle Spektrometrisi**

Proteomik çalışmalarında kütle spektrometrisinin önemi, kütle spektrometrisi kullanılmaya başladıktan sonra proteomik çalışmalarındaki artıştan da anlaşılmaktadır [20]. Kütle spektrometrisi yönteminin sağladığı analiz kolaylığı, hassasiyet ve hızlı analiz edebilme özelliği gibi pek çok avantaj ve üstün özellikleri sayesinde proteomik çalışmaları hız kazanarak pek çok bilim insanını da bu alana yönelmiştir [21].

### **2.3. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ**

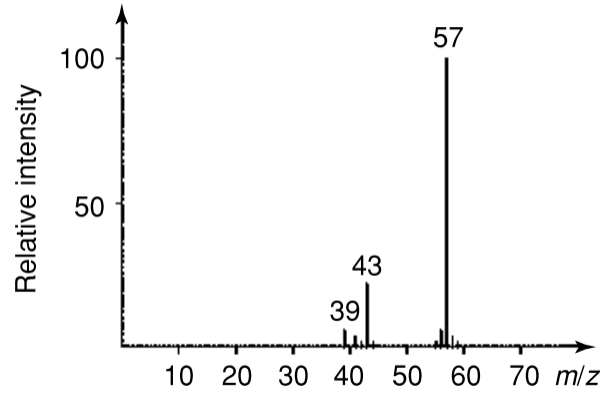
Kütle spektrometrisi, protein, DNA, polimer gibi yüksek molekül ağırlığına sahip moleküllerin kimyasal yapı analizlerine imkân sağlayan çok önemli bir analiz yöntemidir. Kütle spektrometrisi analiz yönteminde bileşikler yüksek vakum ortamında gaz fazına getirilerek iyonlaştırılırlar. Eşitlik 2.1'de görüldüğü gibi molekül bir elektron kaybederek  $M^{+}$  radikalik moleküler iyonuna dönüşür.



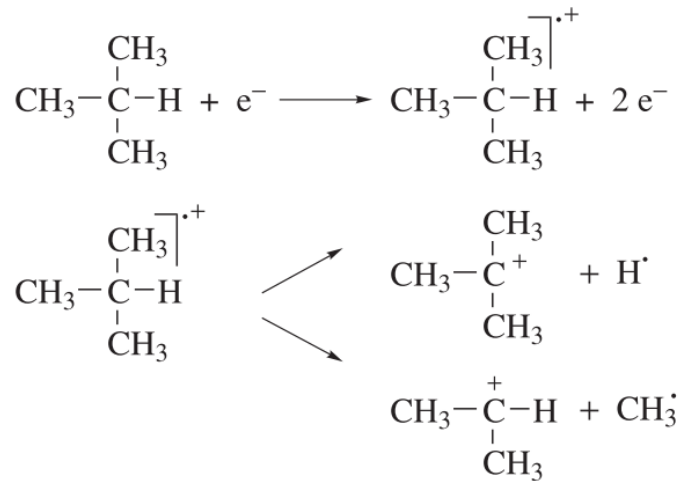
İyonlaştırılan atom ya da moleküller bağlı kütlelerine yani kütle/yük oranlarına göre grafiğe çevrilir. Bu grafiğe kütle spektrumu adı verilir. Bu yöntemde Infrared ve

NMR yöntemlerinden farklı olarak yapısal bileşim moleküler kütlesi cinsinden ifade edilir. Dolayısıyla bir kütle spektrumunda analit'in molekül ağırlığı da doğru olarak belirlenir.

Örneğin şekil 8'de görülen kütle spektrumu izobütan molekülüne aittir. m/z değeri 57 olan pik izobütanın moleküler iyon piki olup kimyasal yapısı şekil 9'da gösterilmiştir. m/z 43 piki ise izobütan molekülünün iyonlaşırken bir hidrojen değil de bir metil grubu kaybetmesiyle oluşan moleküle ait piktir. Şiddeti daha düşük olan 39 değerindeki pik de  $C_3H_3^+$  aromatik siklopropenyum iyonuna ait olabilir.



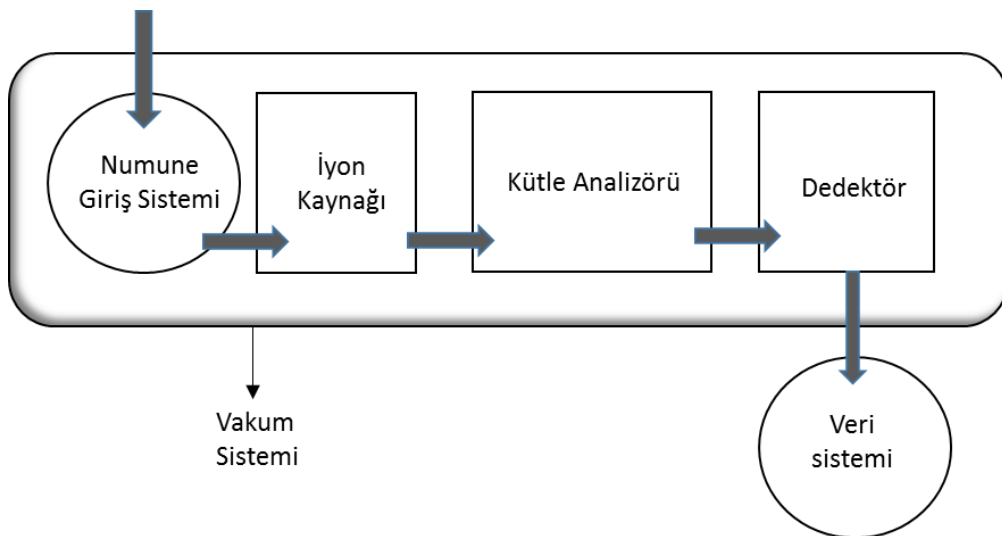
Şekil 8. İzobütan'ın kütle spektrumu [22]



Şekil 9. İzobütanın iyonlaşması [22]

### 2.3.1. Genel Prensip

Bir kütle spektrometresi cihazının temel bileşenleri; numune giriş sistemi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri sistemidir. Genel prensip olarak öncelikle yaklaşık 1 mikromol ya da daha az miktardaki örnek, numune giriş sistemi tarafından yüksek vakum altında cihaz içine iletilir ve iyon kaynağı vasıtasıyla iyonlaştırılır. İyonize olan moleküller kütle analizöründe kütle/yük oranlarına göre birbirinden ayrılarak dedektöre ulaşırlar. Elektrik alan, manyetik alan, dört kutuplu (quadrupol) ya da uçuş zamanlı (TOF) gibi teknik özelliklere sahip olan kütle analizörleri bu özellikleri sayesinde iyonların, kütle/yük oranlarına göre birbirinden farklı oranlarda hızlanarak birbirlerinden ayrılmasını sağlar. Farklı hızlardaki iyonlar dedektöre farklı sürelerde çarparlar ve dedektöre çarpan iyonların şiddeti zamanın bir fonksiyonu olarak veri sisteminde kaydedilir [23]. Cihazın içinde örneğin analizi gaz fazında yapılırsa da örnek sisteme katı, sıvı ya da gaz fazında verilebilir. Sistemin genel olarak yüksek vakum altında tutulmasının sebebi gaz fazına dönüştürülen analit iyonlarının birbirleriyle ve ortamdaki hava molekülleri ile çarpışarak parçalanmalarını önlemektir. Kütle spektrometrelerinin GC-MS, MALDI-TOF-MS, ESI-MS gibi farklı örnek verme sistemi, farklı iyon kaynağı ya da farklı kütle analizörlerine sahip türleri vardır. Hangi kütle spektrometrik yöntemin kullanılacağına analitin türüne göre karar verilmelidir. Analitin fazı, yaklaşık molekül ağırlığı ya da uçuculuğu gibi özellikler hangi bileşenlere sahip kütle spektrometresinin kullanılacağına belirlenmesinde önemli faktörlerdir.



Şekil 10. Kütle spektrometresi bileşenlerinin şematik gösterimi

## 2.3.2. Kütle Spektrometresi Bileşenleri

### 2.3.2.1 Örnek Verme Sistemi:

Yaklaşık 1 mikromol örnek gazlaştırılarak yüksek vakum altında ( $10^{-5}$  Torr basıçta) iyon kaynağına gönderilir. Önemli bir amacı iyon kaynağına en az vakum kaybıyla numunenin iletilmesini sağlamaktır. Enjektör, numune tutucu plaka, prob gibi araçlarla doğrudan giriş sistemiyle ya da diğer kromatografik cihazların çıkışına bağlamak gibi yöntemlerle örnek sisteme verilebilir.

### 2.3.2.2. İyon Kaynağı

İyonlaştırma bölgesinde elektron bombardımanı, lazer gibi çeşitli metotlarla molekül iyonlaştırılarak hızlandırılması sağlanır. Molekül çoğunlukla pozitif yüklü olacak şekilde iyonlaşsa da negatif olarak da iyonlaşabilir ve her iki türlü de analiz edilebilir.

İlk zamanlarda kullanılan iyon kaynağı çoğunlukla elektron bombardımanıydı ancak sonradan alan desorpsiyon (Field Desorption, FD), matriks yardımcı lazer desorpsiyon (Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization, MALDI), hızlı atom bombardımanı (Fast Atom Bombardment, FAB) gibi yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. İyonlaştırıcı ve tipine göre iyon kaynakları tablo 3'de görüldüğü gibi sınıflandırılabilir. Sonradan kullanılan bu yöntemlerin birtakım avantajları vardır.

Tablo 3. İyon Kaynakları

Temel Tip	İyon Kaynağı Adı	İyonlaştırıcı
Gaz fazı	Elektron Bombardımanlı (EI)	Enerjik elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırma (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma (FI)	Yüksek potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyon (FD)	Yüksek potansiyelli elektrot
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alan
	Matriks yardımcı desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI)	Lazer demeti
	Plazma desorpsiyonu (PD)	$^{252}\text{Cf}$ 'nin fisyon ürünleri
	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil iyon kütle spektrometrisi (SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termosprey iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık

### **2.3.2.2.1. Elektron Bombardımanlı Kaynağı**

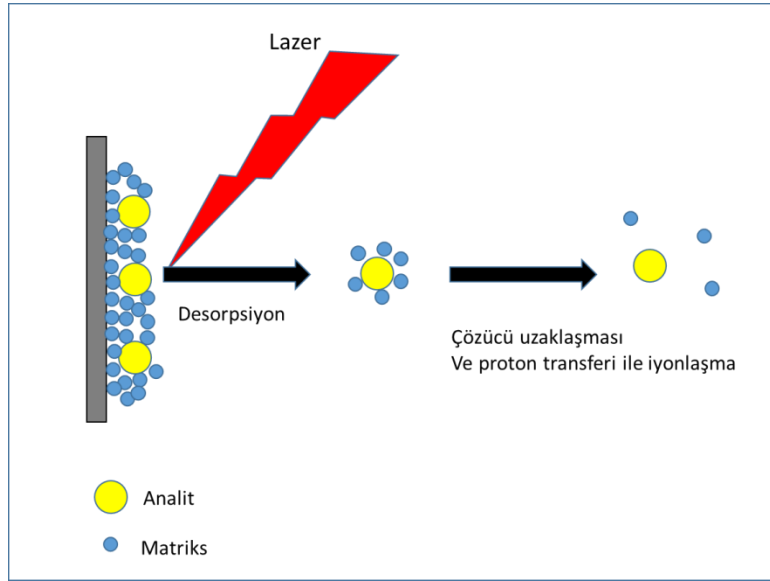
Bu yöntemde numune yüksek sıcaklığa ısıtılarak buharlaştırılır ve elektronlarla bombardıman edilerek iyonlaştırılır. Elektronlar ısıtılan tungsten veya renyum telden yayılır ve yaklaşık 70 V'luk potansiyel tarafından tel ve anot arasında hızlandırılırlar. Elektronlar ve analit moleküllerini izlediği yollar birbirine diktir. Yolların kesişim noktasında çarpışma sonucu moleküller pozitif yüklü iyonlara dönüşerek hızlandırma yarıklarından geçer ve kütle analizörüne ulaşırlar. Elektron bombardıman kaynağı çok verimli bir yöntem olmasa da kütle spektrumu kütüphanelerinin çoğu bu teknikle elde edilen verilerle oluşturulmuştur.

### **2.3.2.2.2. Elektrosprey iyonizasyon (ESI)**

Elektrosprey iyonizasyon yumuşak bir iyonlaşma tekniğidir. Polar ve uçucu olmayan bileşikler için en uygun iyonlaştırma yöntemidir. Proteinler, peptitler, nükleik asiler gibi biyolojik moleküller için kullanılabilir [24]. Elektrosprey iyonlaşma kaynağında, yüksek voltaj uygulanabilen ince bir iğne yardımıyla sıvı örnek çözeltisi içinden numune alınarak kaynak odacığına püskürtülür. Uçucu zc buharlaşırken geriye sadece yüklü olan analit molekülleri kalır. Özellikle polipeptitler gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin analizi için en çok kullanılan iyonlaştırma yöntemleri ESI ve MALDI'dir [25], [26].

### **2.3.2.2.3 Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI)**

Bu yöntem 1988 yılında Karas ve Hillenkamp tarafından ortaya çıkmıştır. Oligonükleotitler, proteinler, sentetik polimerler ya da büyük inorganik bileşikler gibi yüksek molekül ağırlıklı, uçucu olmayan, termal olarak karasız moleküllerin intakt olarak iyonlaştırılmasına olanak sağlayan yumuşak bir iyonlaştırma yöntemidir [27],[22]. Hızlı atom bombardımanı ve lazer desorpsiyon yöntemlerine benzese de farklı olarak bu yöntemde matriks kullanılır. Matriks, analitle kimyasal reaksiyona girmeyen, analiti çözebilen, uçuculuğu düşük olan, kullanılan lazerin dalga boyundaki ışını absorplayabilen moleküllerden oluşan bir solventtir. Lazerin fazla enerjisini absorbe ederek analitin intakt olarak yani parçalanmadan iyonlaşmasını sağlar. [28] Lazer olarak en yaygın kullanılan tür azot lazerleridir. Azot lazerleri 337 nm dalga boyunda ışınım yapar. UV bölgede absorpsiyon yapan matriksler için kullanılır. Bununla beraber IR bölge için de Er-YAG lazerleri ya da CO<sub>2</sub> lazerleri kullanılabilir.



Şekil 11. MALDI iyonlaşma prensibi şematik gösterimi

#### 2.3.2.2.4 MALDI Genel prensibi

Öncelikle numune hazırlığı yapılmalıdır. Literatürde çeşitli numune hazırlama yöntemleri bulunmaktadır. Analit çözeltisinin uygun bir matriks çözeltisi ile uygun oranlarda karıştırılması gerekmektedir. Uygun matriksin seçimi çok önemlidir [29]. Matriks seçimi kullanılacak lazerin dalga boyuna ve analitin yapısına bağlı olarak yapılır [22].

Tablo 4. Bazı yaygın kullanılan UV-MALDI matriksleri

Analit	Matriks	Kısaltma
Peptitler / Proteinler	$\alpha$ -siyano-4-hidroksisünamik asit 2,5-dihidroksibenzoik asit 3,5-dimetoksi-4-hidroksisünamik asit	CHCA DHB SA
Oligonükleotitler	Trihidroksiasetofenon 3-hidroksipikolinik asit	THAP HPA
Karbonhidratlar	2,5-dihidroksibenzoik asit $\alpha$ -siyano-4-hidroksisünamik asit Trihidroksiasetofenon	DHB CHCA THAP
Sentetik Polimerler	Trans-3-indolakrilik asit Ditranol 2,5-dihidroksibenzoik asit	IAA DIT DHB

Organik Moleküller	2,5-dihidroksibenzoik asit	DHB
İnorganik Moleküller	Trans-2-(3-(ter-bütilfenil)-2-metil-2-propeniliden) malononitril	DCTB
Lipidler	Ditranol	DIT

Kurutulmuş damlacık metoduna göre 5-10 µl doygun matriks çözeltisi içerisinde 1-2 µl analit çözeltisi ilave edilerek karıştırılır. Bu karışımdan 0,5-2 µl kadarı metal bir plaka üzerine damlatılarak, kristallendirilir. Bu esnada analitin içinde çözündüğü uçucu çözücü uzaklaştırılmış olur. Geriye kristallenmiş olan analit ve matriks karışımı kalır. Kristallenen bu karışım metal plaka ile birlikte sisteme verilir. Yüksek vakum altında metal plaka ile analizör (örneğin uçuş zamanlı kütle analizörü, TOF) arasına bir elektriksel alan uygulanır. Metal plaka yüzeyinde kristallenen analit-matriks karışımı üzerine kesikli lazer ışını gönderilir. Lazer ışını fotonları, matriks ve analit moleküllerini uyararak gaz fazına geçmelerini sağlar. Genellikle bu moleküller gaz fazına geçerken aynı zamanda  $[M+H]^+$  ya da  $[M-H]^-$  şeklinde iyonlaşırlar. Pozitif iyon modun da elde edilen kütle spektrumlarında genellikle elde edilen pikler  $[M+H]^+$  şeklinde protonlanmış moleküllere aittir. Bununla beraber tampon çözeltiden gelen sodyum ya da potasyum gibi alkali metal iyonlarla birlikte  $[M+Na]^+$  ya da  $[M+K]^+$  şeklinde de iyonlaşabilir. Bu tip durumları önlemek amacıyla analit çözeltisi içerisinde bulunan tuzlar ortamdaki uzaklaştırılmalıdır ya da bunun için çözeltiliye bir miktar asit eklenebilir. Ayrıca birden fazla yüklü iyonlar ya da parçalanmış analit molekül iyonları da oluşabilir. Lazerin fazla enerjisini absorbe ederek parçalanmayı önlemek açısından matriks kullanımı çok önemlidir.

### 2.3.2.3. Kütle Ayırıcılar

İyonlaştırma bölgesinde gaz fazında iyonlara dönüşen analit molekülleri birbirinden ayrılmak üzere kütle ayırıcı bölmesine geçerler. Farklı prensiplere göre ayırım yapan çeşitli kütle analizörleri vardır (tablo 5.) [22]. Kütle ayırıcı bölmesinde uygulanan elektrik alan sayesinde moleküllere kinetik enerji kazandırılarak kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre farklı oranlarda hızlandırılırlar ve bu sayede birbirlerinden ayrılırlar. Pozitif iyon modun da yapılan analizlerde genellikle iyon +1 yüklü olduğundan elde edilen kütle/yük oranları genellikle molekülün kütlelerine eşittir. Eğer çoklu yük oluşumu var ise  $m/z$  değeri gerçek kütlelerinin kesirli bir kısmıdır.

Tablo 5. Kütle spektrometresinde kullanılan kütle ayırıcı türleri ve ayırma prensipleri

Kütle Ayırıcı	Sembol	Ayırma prensibi
Elektrik sektör	E veya ESA	Kinetik enerji
Manyetik Sektör	B	Momentum
Dört Kutuplu	Q	m/z (frekans değişimi)
İyon tuzağı	IT	m/z (rezonans frekansı)
Uçuş zamanlı	TOF	Hız (uçuş zamanı)
Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans	FTICR	m/z rezonans frekansı
Fourier dönüşümlü orbitrap	FT-OT	m/z rezonans frekansı

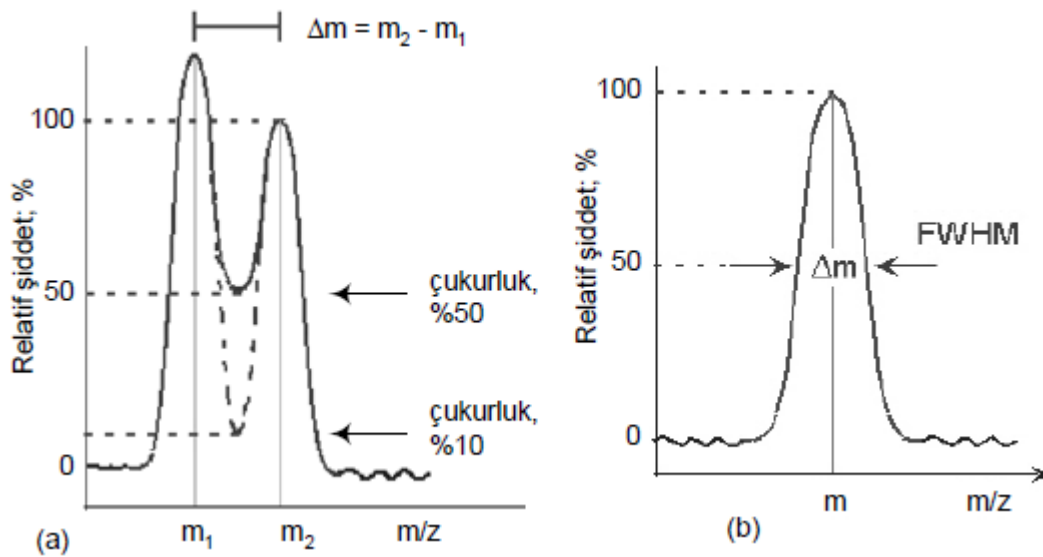
İdeal bir kütle ayırıcı küçük kütle farklarını ayırt edebilecek duyarlılıkta olmalıdır. Bununla beraber ölçülebilir iyon akımları elde etmek için yeterli sayıda iyonun geçişini de sağlayabilmelidir. Ancak kütle ayırıcılarda duyarlılık artırılırken geçirgenlik azalır ve optimum ara çözüm bulunmalıdır.

### 2.3.2.3.1. Kütle Spektrometrelerinin Ayırma Gücü

Ayırma gücü R ile gösterilir ve kütle spektrometresinin kalitesini ifade eder.

$$R = m / \Delta m \quad (\text{Eşitlik 2.2})$$

Eşitlik 2.2'deki  $\Delta m$  iki komşu pik arasındaki kütle farkı olup, m ise komşu piklerden birincisinin kütlesidir. Genellikle iki pik arasındaki boşluğun yüksekliği piklerin kendi yüksekliklerinin %50'sinden fazla değil ise o iki pik ayrılmış olarak kabul edilir ancak ideali %10'u geçmemesidir. Bu durumda örneğin 4000 ayırma gücüne sahip bir spektrometrede 400,0 ve 400,1 m/z değerlerindeki pikler birbirinden ayrılabilir.



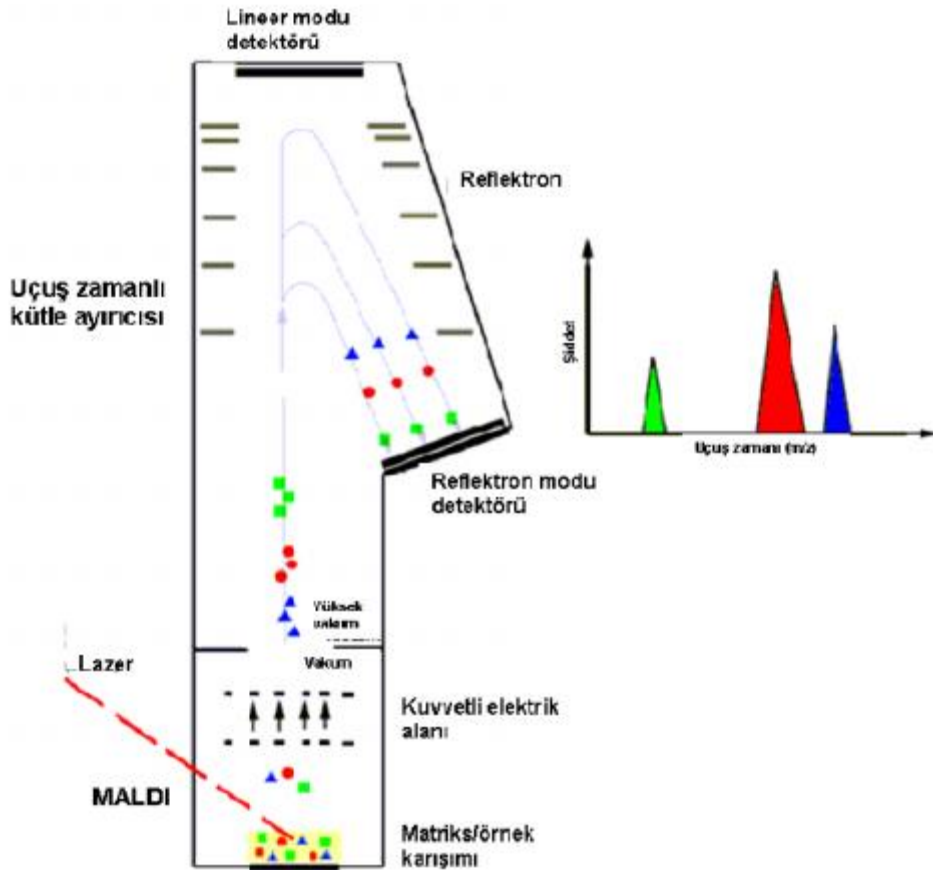
Şekil 12. Ayırma gücünün spektrum üzerinde gösterilmesi



Bir spektrometrede tercih edilmesi gereken ayırma gücü uygulama amacına göre değişir. Örneğin tam kütleleri sırasıyla 28,0313; 28,0187; 28,0061 ve 28,8949 olan  $C_2H_4^+$ ,  $CH_2N^+$ ,  $N_2^+$ ,  $CO^+$  iyonlarını ayırmak için ayırma gücü birkaç bin olan bir spektrometre gereklidir. Bunun yanında kütleleri sırasıyla 17 ve 16 olan  $NH_3^+$  ve  $CH_4^+$  iyonlarını ayırt edebilmek için 50 ayırma gücü yeterlidir. Ticari olarak 500'den 500000 ayırma gücüne kadar kütle spektrometreleri mevcuttur [30].

### 2.3.2.3.2. Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcılar

Uçuş zamanlı (TOF) kütle ayırıcılarda yaklaşık 0,5-2 metre uzunluğunda bir uçuş tübü bulunur. İyonlar  $10^3-10^4$  V'luk elektrik alan pulslarıyla hızlandırıldıktan sonra bu tüpün içerisinden geçerler. Tüpe giren bütün iyonlar ideal olarak aynı kinetik enerjiye sahip olsalar bile, kütleleriyle ters orantılı olarak farklı hızlara sahip olurlar. Daha hafif olan kütleler daha yüksek hıza sahip olup detektöre daha erken ulaşırlar; daha ağır olan iyonlar ise daha düşük hıza sahip olup detektöre daha geç ulaşırlar. Bu sayede iyonların kütlelerine göre birbirlerinden ayrılması ve her birinin sinyalleri ayrı ayrı uçuş sürelerine bağlı olarak tayin edilmeleri sağlanır. Tipik olarak iyonların detektöre ulaşma hızları 1-30  $\mu s$  arasında değişir.



### Şekil 13. MALDI-TOF şematik gösterimi

Uçuş zamanlı (TOF) kütle ayırıcısı sınırsız kütle aralığında analize olanak vermesi, çok yüksek hızda veri kaydedebilmesi ve yüksek duyarlılıkta olması açısından diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Lineer ve refletron modu olmak üzere iki farklı modu olan uçuş zamanlı kütle ayırıcısı sıklıkla MALDI iyonlaştırma tekniği ile birlikte kullanılır ve MALDI-TOF olarak adlandırılır. Bazı durumlarda aynı kütleyle sahip iyonlar aynı anda desorbe olamamaları sebebiyle farklı hızlar kazanarak farklı zamanlarda detektöre ulaşabilirler. Bu durum ilgili kütle için pik genişlemesine ve ayırıcılığın genişlemesine sebep olabilir. Bunu önlemek için refletron modu tercih edilebilir. Refletron modun da uçuş tüpünün sonunda iyonların yönünü değiştiren ve iyon yolunu uzamasını sağlayan bir kuvvet uygulanır. Bu şekilde karşı bir elektrik alan uygulanması sayesinde eşit kütleli fakat farklı hızlardaki iyonlar birbirlerine yetişebilirler. Böylece pik genişlemesi önlenmiş olur. Ancak bu modun bir dezavantajı yarı kararlı iyonların parçalanmasına sebep olabilir. Lineer mod kullanılması düşük miktardaki ya da iyonlaşma potansiyeli düşük moleküllerin de detektöre ulaşarak hassas bir şekilde gözlemlenmesini sağlar.

#### 2.2.2.4. Kütle Detektörleri

Kütle spektrometresinde Faraday kafesi, çok kanallı plakalar, elektron çoğaltıcı, foton çoğaltıcı gibi detektör sistemleri kullanılır. Detektör sistemleri kütle analizöründen çıkarak kendilerine ulaşan iyonların sinyallerinin kaydedilebilmesi için yüzeylerinde çarpan iyonların enerjileri elektriksel enerjiye dönüştürülür. Daha sonra bu sinyaller bilgisayar yardımıyla kütle spektrumu adı verilen yorumlanabilir verilere dönüştürülür.

#### 2.2.3. Tandem Kütle Spektrometresi

Bu spektrometre türü iki tane ya da daha fazla sayıda kütle spektrometresinin birleştirilmesinden oluşur, ardışık kütle spektrometresi olarak da adlandırılır ve MS/MS olarak ya da MS<sup>n</sup> olarak gösterilir. Buradaki n sayısı kaç tane kütle spektrometresinin ard arda bağlandığını belirtir. Bu yöntemde ilk spektrometrede genellikle yumuşak bir iyonlaştırma tekniği seçilir. Böylelikle birinci cihazdan moleküller parçalanmadan moleküler olarak iyonlaşırlar. Ardından bu iyonlar ikinci spektrometreye girerek genellikle içinden helyum (He), Argon (Ar) ya da azot (N<sub>2</sub>) inert gazı geçen çarpışma hücresi (collision cell) girerler. İyonların inert gaz

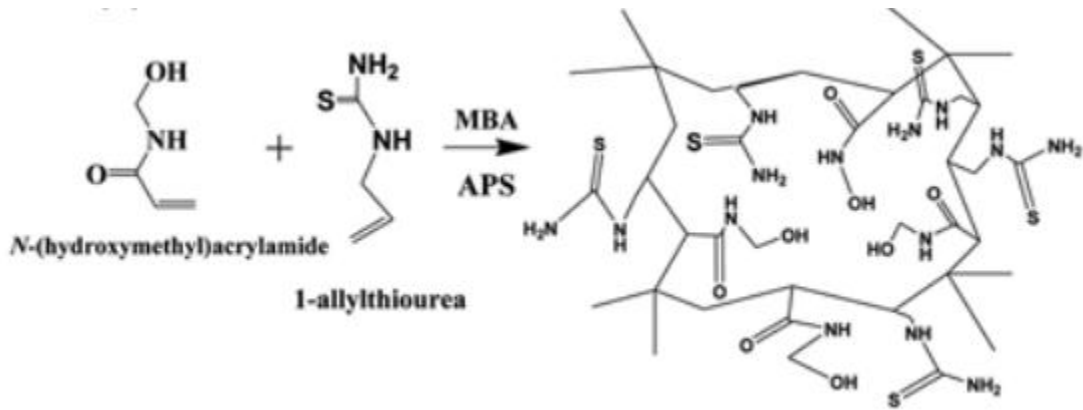
atomlarıyla çarpışmaları sonucu daha küçük parçalanma ürünlerine parçalanırlar. Bu yöntem tek spektrometre ile birbirinden ayrılması zor olan izomerlerin ve aynı kütleyle sahip moleküllerin birbirinden ayrılmasını sağlar ve yapısal özelliklerinin yorumlanmasına yardımcı olur.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Amin Fonksiyonel Gruplu Polimer Malzemelerin Sentezi

##### 3.1.1. Poli(NH-AT) hidrojenlerinin sentezi

Poli(NH-AT) (Poli(*N*-hidroksimetil)metakrilamit-alliltiyüre) hidrojenlerinin sentezi *N*-(hidroksimetil)metakrilamit (NH) ve 1-allil-2-tiyüre (ATU) monomerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı oranlarda olmak üzere toplamda 1 mL NH-AT-su üçlü karışımı 3 mm yarıçapındaki polivinilklorür (PVC) pipetlere yerleştirilerek  $^{60}\text{Co}$  kaynağı (Russian-made PX-30 Isslodovatelj; 1.97 kGy/h) ile 70 dk boyunca  $\gamma$  ışınına maruz bırakılmıştır. Pipetten alınan hidrojenler reaksiyona katılmayan fazla monomerleri uzaklaştırmak amacıyla birkaç kere destile su ile yıkanmasının ardından ilk olarak açık havada daha sonra vakum fırın içinde  $60^{\circ}\text{C}$ 'de 5 gün kurutularak desikatörde muhafaza edilmiştir. ATU oranı %2.5, %5.0, %7.5 ve %10.0 olacak şekilde 4 farklı tip hidrojen sentezlenmiştir.



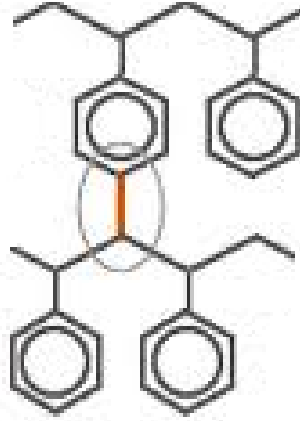
Şekil 14. (Poli(*N*-hidroksimetil)metakrilamit-alliltiyüre) sentez reaksiyonu

##### 3.1.2. Amin Fonksiyonel Grupları Bağlanmış Poli(stiren-ko-divinilbenzen) Mikrokürelerin (NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB) Sentezi

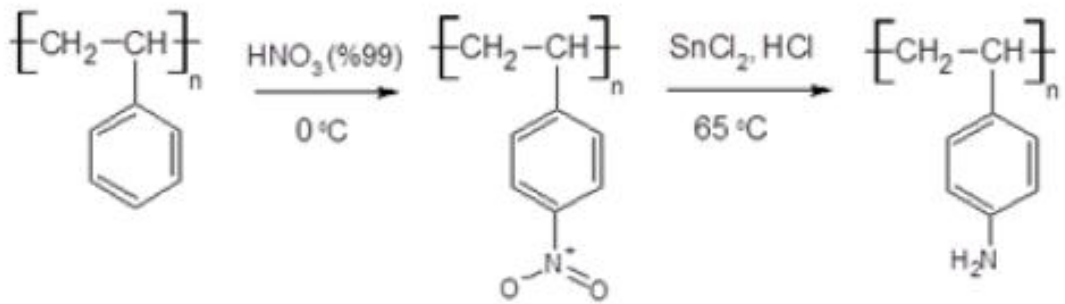
NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB sentezi için başlangıç maddesi olarak Poli(stiren-ko-divinilbenzen) seçilmiştir. Poli(stiren-ko-divinilbenzen) maddesi önce nitrolanmış daha sonra indirgenerek amin fonksiyonel gruplu poli(stiren-ko-divinilbenzen) küreler elde edilmiştir. Bu amaçla hazır alınan PSDVB mikro-kürelerden 1,00 g tartılarak buz banyosunda soğutulmuştur. Buz banyosunda soğutulmuş PSDVB 5,0 mL ağırlıkça %98'lik HNO<sub>3</sub> içerisine azar azar eklenmiştir ve sıcaklık  $5^{\circ}\text{C}$ 'yi geçmemesine dikkat edilmiştir. Karışım 1 saat kadar buz banyosunda karıştırıldıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. 2 saatin sonunda 100 mL su-buz karışımına dökülerek süzölmüştür ve bol su ile yıkanarak nitrik asidin

tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Uçuk-sarı renkteki NO<sub>2</sub>-PSDVB küreler aseton, etanol ve tekrar aseton ile yıkandıktan sonra vakumda kurutulmuştur.

Elde edilen NO<sub>2</sub>-PSDVB kürelerdeki nitro gruplarının amin'e indirgenmesi SnCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O/HCl kullanılarak yapılmıştır. 1 g NO<sub>2</sub>-PSDVB cam balon içindeki 5 mL %37'lik hidroklorik asit içerisine eklenerek 4 g SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ilave edildikten sonra 65 ° C'da su banyosunda ısıtılmıştır. Yaklaşık 48 saatlik indirgenme reaksiyonu süresi sonunda elde edilen NH<sub>2</sub>-PSDVB küreler süzölmüştür. İki defa derişik HCl içinde bekletilerek 1 M NaOH çözeltisi, su ve aseton ile yıkanmış ve vakumda kurutulmuştur.



Şekil 15. Poli(stiren-divinilbenzen)(PSDVB) bileşğinin kimyasal yapısı



Şekil 16. Poli(stiren-ko-divinilbenzen) sentez şeması

### **3.1.3. Amin Fonksiyonel Grupları Bağlanmış Çapraz Bağlı Olmayan Polistiren (NH<sub>2</sub>-PS) Sentezi**

Çapraz bağlı PSDVB kürelere uygulanan kimyasal modifikasyonun aynısı polistiren (PS) polimerine uygulanmıştır. PS polimerine nitrolama ve indirgeme basamaklarının uygulanması sonucunda yarı çözünebilen ve daha çok şişme özelliği gösteren genellikle düz zincir (lineer) yapısında amin fonksiyonel grupları içeren (NH<sub>2</sub>-PS) polimerleri elde edilmiştir.

### **3.2. Proteinlerin enzimatik parçalanması**

β-kazein ve sığır serum albümin (bovine serum albumin, BSA) proteinleri (1.0 mg) 1.0 mL 50 mM amonyum bikarbonat (pH 8.0) çözeltisinde ayrı ayrı çözülmüştür. Enzimatik parçalamada kullanılan tripsin enzimi de, 1.0 mL 50 mM amonyum bikarbonat (pH 8.0) çözeltisi içerisinde ayrıca hazırlanmıştır. Her iki protein de tripsin enzimi çözeltisi ile birlikte 1:10 (enzim/protein) mol oranında karıştırılmış ve karışımlar, 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ancak BSA proteini, yapısı içerisinde disülfid bağları bulduğundan dolayı enzimatik parçalama işlemi öncesinde ayrıca denatürasyon işlemine maruz bırakılmıştır. BSA çözeltisi, 50 µL 8 M üre çözeltisi eklenerek 30 dakika boyunca 37 °C'de bekletilmiştir. Denatüre olan protein yapısındaki disülfid bağlarının kırılması amacıyla çözeltiliye 50 µL 10 mM 1,4-ditiotireitol (DTT) eklenerek çözelti, 37 °C'de 1 saat bekletilmiştir. 50 µL 20 mM iyodoasetamid (IAA) kullanılarak karışım, enzimatik parçalamanın hemen öncesinde karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Hacimce 1%'lik trifloroasetik asit/su çözeltisi kullanılarak enzimatik parçalama işlemleri sonlandırılmıştır. Çözeltiler analiz öncesinde -80 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

### **3.3. Zenginleştirme Yöntemi**

#### **3.3.1. Adsorpsiyon Basamağı**

Tez kapsamında farklı özelliklere sahip polimerik malzemelerle fosfopeptit zenginleştirme çalışmaları fosfopeptit kaynağı olarak β-kazein proteini ve gerçek örnek olarak inek sütü kullanılmıştır. Tüm protein ve süt çözeltileri enzimatik olarak parçalandıktan sonra zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. β-kazein proteini kullanılırken, sığır serum albumin (BSA) proteini ile 2:3 (v/v) oranında karıştırılmış ve bu sayede malzemelerin daha karmaşık ortamdaki zenginleştirme kabiliyetleri incelenmiştir. Bunun dışında farklı pH koşullarının, farklı β-kazein derişimlerinin ve ortamda BSA varlığının adsorpsiyon kapasitesine etkileri de değerlendirilerek en uygun koşullar bulunmuştur. Standart olarak

uygulanan zenginleştirme yönteminde ilk olarak amin fonksiyonel gruplu polimerlerden belirli miktarlarda (poli(NH-AT) hidrojelinden 10 mg, NH<sub>2</sub>-PS polimerinden 5 mg ve NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimerinden 5 mg) tartılmıştır. Poli(NH-AT) hidrojel öncelikle tek bir parça halinde alınarak zenginleştirme yöntemi denenmiş fakat iyi sonuç alınamayınca yüzey alanını genişletmek amacıyla havanda öğütülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda tartılmış ve/veya öğütülmüş haldeki her bir polimer üzerine 70 µL asetat tampon çözeltisi (pH:4,0) ve 10 µL kadar asetonitril şartlandırma çözeltisi olarak eklenmiştir. Daha sonra enzimatik olarak parçalanmış β-kazein ile BSA karışımından 25 µL (2:3, v/v) ya da inek sütünden 50 µL ilave edilerek malzemeyle iyice etkileşebilmesi için vortex üzerinde 30 dakika boyunca karışması sağlanmıştır. Sonrasında santrifüj edilerek dibe çöktürülen malzemenin üzerinden fosfopeptitler haricindeki türler içerdiği düşünülen sıvı kısım alınmıştır. Fosfopeptitlerin tutunduğu düşünülen polimer malzeme üzerinde halen kalmış olabilecek safsızlık, tuz veya fosfopeptit haricindeki peptitlerin uzaklaştırılması amacıyla 3 kere 1 mL asetat tamponu/asetonitril (4:1, v/v) karışımı ile yıkama yapılmıştır.

### **3.3.2. Desorpsiyon ve Elüsyon Basamağı**

Elektrostatik etkileşimlerle malzemeye tutunmuş olduğu düşünülen fosfopeptitleri malzemedan ayırmak için trifloroasetik asit katkılı asetonitril/su (1:1, v/v, ve %0.1 TFA, trifloroasetik asit) desorpsiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Yıkanmış olan malzeme üzerine çok asidik olan (pH~1) bu desorpsiyon çözeltisinden poli(NH-AT) için 40 µL, NH<sub>2</sub>-PS için 200 µL, NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB için 100 µL eklenmiştir. Yüksek hızda karıştırma ve santrifüj yapıldıktan sonra malzemelerde kalan, fosfopeptitlerin desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen desorpsiyon çözeltisi MALDI-MS ile analiz edilmek üzere saklanmıştır. Ayrıca desorpsiyon süresinin etkisini araştırmak amacıyla, anında desorpsiyonun yanı sıra malzeme desorpsiyon çözeltisi ile 30 dk boyunca inkübe edilerek bekleme süresinin zenginleştirme verimine etkisi incelenmiştir.

### **3.4. MALDI Kütle Spektrometresi Analizleri**

MALDI-kütle spektrometresi ile analiz için 2,5-dihidroksibenzoik asit matriksi seçilmiştir. Matriks çözeltisi %1,0 orto-fosforik asit içeren, 1:4, (v/v), su/asetonitril karışımında, 20 mg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Analiz edilecek örnek ile matriks çözeltisi 1:10 (v/v) oranında karıştırıldıktan sonra MALDI plaka üzerine 1

$\mu\text{L}$  kadar damlatılmıştır. Plaka üzerinde kuruyan örnek-matriks karışımı MALDI-kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir.



#### 4. TARTIŞMA VE YORUM

Fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kovalent bağlanmaya veya kovalent olmayan etkileşimlere dayalı farklı yöntemler ve malzemeler kullanılmaktadır. Bu çalışmalar genellikle metal-fosfopeptit, fonksiyonelize polimer-fosfopeptit veya fonksiyonelize sol-jel-fosfopeptit ya da iyon değiştirici reçineler ile yük ayırımına dayanarak gerçekleştirilmektedir. Temel prensip fosfopeptit üzerindeki fosfat grupları ile özgün etkileşime girebilecek türler içeren malzemeler kullanılarak fosfopeptitlerin seçimli olarak ayrılması ve belli bir yerde toplanmasına dayanmaktadır.

Bir zenginleştirme işleminin verimli ve etkin bir şekilde gerçekleşebilmesi için üzerinde çalışılması gereken çeşitli parametreler vardır. Öncelikle fosfopeptitlerin fosfat grupları ile özgün olarak etkileşebilecek malzeme teorik olarak önerilir ve malzeme uygun yöntemle sentezlenir. Ancak uygun malzemenin üretilmesi zenginleştirme işleminin en uygun şekilde ve yüksek verimde gerçekleşmesini sağlamak için yeterli değildir. Fosfopeptidin içerisinden saflaştırılacağı peptit karışımı miktarının malzeme miktarına oranı, fosfopeptitlerin yüzeye tam olarak tutunmaları ve yüzeyden tam olarak geri kazanılabilmeleri için gerekli olan süre, adsorpsiyon/desorpsiyon basamakları sırasında ortamın pH değeri ve iyonik şiddeti gibi parametrelerin optimize edilmeleri gerekmektedir.

Fosfopeptit zenginleştirme yöntemleri geliştirilirken yöntemin pratikliğinin sağlanması ve biyomoleküllerin yapılarının bozulmadan korunabilmeleri amacıyla aşırı uç koşullar yerine daha yumuşak ortam koşullarının sağlanması önemlidir. Yüzey üzerindeki amin gruplarının pKa değerlerinin yaklaşık 10-11 olduğu bilindiğinden, çalışma esnasında ortamın pH değeri, bu değerinin altında ve fosfopeptitlerin fosfat gruplarının pKa değerlerinin üstünde tutulduğunda ilgili uç grupların birbirleriyle etkileşebilecekleri öngörülmektedir.

Tez kapsamında, fosfopeptit zenginleştirilmesi için amin fonksiyonel grubu içeren 3 farklı tip malzeme sentezlenmiştir. Bu malzemelerin üzerindeki amin gruplarının uygun pH ve iyonik şiddet seviyelerinde fosfopeptitlerin fosfat grupları ile elektrostatik etkileşime girmeleri sağlanmıştır. Belirli bir süre beklendikten sonra elektrostatik etkileşimler yardımıyla fosfopeptitlerin malzeme yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tez kapsamında yürütülen

çalışmalarda değişik pH koşulları denenmiş ve fosfopeptitlerin adsorpsiyonu için en uygun pH değerinin 4 olduğu belirlenmiştir. Yüzeyle etkileşime girmeyen dolayısıyla yüzeye tutunmayan fosfopeptit haricindeki peptitleri ve ortamdaki tuzları uzaklaştırmak için gerekli yıkamalar yapıldıktan sonra seçimli olarak malzemeye tutunan fosfopeptitlerin kütle spektrometresi ile analiz edilebilmesi için geri kazanılması için desorpsiyon işleminin yapılması gereklidir. Bu işlem sonucunda yüzeyde bulunan fosfopeptitlerin negatif yüklü fosfat gruplarının protonlanması ve nötral hale gelerek yüzeyden ayrılmaları sağlanmaktadır. Bu durumda fosfopeptitlerin fosfat gruplarının pKa değerlerinin altındaki bir pH değerinde tutulmaları ve protonlanarak nötral halde olmaları sağlanmalıdır. Bu nedenle tez kapsamındaki çalışmalarda desorpsiyon işlemi için pH 2 değerinin altındaki ortam koşullarının en uygun koşullar olduğu belirlenmiştir.

Poli(NH-AT) hidrojelleri ile yürütülen zenginleştirme çalışmalarında, hidrojel parçacıkları öğütülerek kullanımı ve bu sayede hidrojel yüzey alanının artırılmasının yanı sıra adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerinin daha kısa sürelerde tamamlanması sağlanmıştır.

Tez kapsamında fosfopeptitlerin analizi ve tayini için MALDI kütle spektrometresi kullanılmıştır. Bilindiği gibi MALDI analizlerinde numunenin analiz öncesinde matriks adı verilen zayıf organik asitlerin zltileriyle değişken oranlarda karıştırılması gerekmektedir. Matriks ile karıştırılmış numuneler sonrasında MALDI rnek plakası yüzeyine oldukça düşük hacimde mikropipet yardımıyla damlatıldıktan sonra kurutulmakta, yüzeyde kristallenen rnek MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmektedir. Bu işlemin başarıya ulaşabilmesi için kullanılacak olan matriksin seçimi oldukça önemli bir süreçtir. Tez kapsamındaki çalışmalarda bu amaçla farklı matriks türleri denenmiş ve fosfopeptitlerin etkin bir şekilde iyonlaştırılabilmeleri için en uygun matriksin 2,5-dihidroksibenzoik asit matriksi olduğu belirlenmiştir.

Tez kapsamında yürütülen çalışmalarda kullanılan, kazein proteininin alt birimlerinin, tripsin ile proteolitik olarak parçalanmaları sonucunda oluşabilecek fosfopeptitlerin  $[M+H]^+$  iyonlarına ait kütle değerleri aşağıda yer alan tablolarda (Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9) verilmektedir. MALDI kütle spektrumunda yer alan fosfopeptitlere ait sinyaller, bu tablolarda yer alan amino asit dizilimlerine sahip fosfopeptitlerle ilişkilendirilmiştir.

Tablo 6.  $\beta$ -kazein proteininden gelen fosfopeptitler

Peptit Simgesi	[M + H] <sup>+</sup>	Modifikasyon	Aminoasit Dizilimi
$\beta_1$	910.9	1Fosfo	(K)AVPYPQR(D)
$\beta_2$	968.0	1Karbamidometil 1Fosfo	(K)AVPYPQR(D)
$\beta_3$	1473.7	1Fosfo	(K)KIEKFQSEEQQQ(T)
$\beta_4$	1672.9	1Fosfo	(K)VLPVPQKAVPYPQR(D)
$\beta_5$	1730.0	1Karbamidometil 1Fosfo	(K)VLPVPQKAVPYPQR(D)
$\beta_6$	2063.0	1Fosfo	(K)FQSEEQQQTEDELQDK(I)
$\beta_7$	2106.7		(F)LLQEPVLPVLRGPFPII(V)
$\beta_8$	2200.0	1Karbamidometil 2Fosfo	(K)FQSEEQQQTEDELQDK(I)
$\beta_9$	2283.6	1Oksidasyon 1Fosfo	(R)DMPIQAFLLYQEPVLPVLR(G)
$\beta_{10}$	2433.4	1Fosfo	(K)IEKFQSEEQQQTEDELQDK(I)
$\beta_{11}$	2490.5	1Karbamidometil 1Fosfo	(K)IEKFQSEEQQQTEDELQDK(I)
$\beta_{12}$	2513.4	2Fosfo	(K)IEKFQSEEQQQTEDELQDK(I)
$\beta_{13}$	2556.2	1Fosfo	(F)QSEEQQQTE DELQDKIHP(F)
$\beta_{14}$	2561.6	1Fosfo	(K)KIEKFQSEEQQQTEDELQDK(I)
$\beta_{15}$	2727.8	1Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{16}$	2864.9	1Karbamidometil 2Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{17}$	2887.8	3Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{18}$	2917.1	1Fosfo	(R)INKKIEKFQSEEQQQTEDELQD K(I)
$\beta_{19}$	2944.8	1Karbamidometil 3Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{20}$	2967.8	4Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{21}$	2991.5	1Fosfo	(D)MPIQAFLLYQEPVLPVLRGPF PII(V)
$\beta_{22}$	3007.5	1Oksidasyon 1Fosfo	(R)DMPIQAFLLYQEPVLPVLRG FPIIV(-)
$\beta_{23}$	3024.8	1Karbamidometil 4Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{24}$	3047.8	5Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{25}$	3083.3	1Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT RINK(K)
$\beta_{26}$	3095.5	1Oksidasyon 1Fosfo	(K)AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPV LPVLR(G)
$\beta_{27}$	3104.8	1Karbamidometil 5Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{28}$	3122.3	4Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT

			R(I)
$\beta_{29}$	3127.7	6Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{30}$	3140.3	1Karbamidometil 1Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT RINK(K)
$\beta_{31}$	3163.3	2Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT RINK(K)
$\beta_{32}$	3175.5	1Oksidasyon 2Fosfo	(K)AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVL GPVR(G)
$\beta_{33}$	3184.8	1Karbamidometil 6Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{34}$	3211.5	1Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT RINK(I)
$\beta_{35}$	3216.6	1Karbamidometil 2Fosfo	(K)AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVL GPVR(G)
$\beta_{36}$	3232.6	1Karbamidometil 1Oksidasyon 2Fosfo	(K)AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVL GPVR(G)
$\beta_{37}$	3243.2	3Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT RINK(K)
$\beta_{38}$	3283.9	6Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT R(I)
$\beta_{39}$	3460.2	1Karbamidometil 5Fosfo	(R)ELEELNVPGEIVESLSSEESIT RINK(K)

Tablo 7. İnek sütünden gelen alpha S1 proteininden gelen fosfopeptitler

Peptit Simgesi	[M + H] <sup>+</sup>	Modifikasyon	Aminoasit Dizilimi
A <sub>1</sub>	828.9	1Phospho	(K)TTMPLW(-)
A <sub>2</sub>	908.8	2Phospho	(K)TTMPLW(-)
A <sub>3</sub>	1589.8	1Phospho	(R)YLGYLEQLLRLK(K)
A <sub>4</sub>	1661.8	1Phospho	(K)VPQLEIVPNSAEER(L)
A <sub>5</sub>	1775.2	1Phospho	(K)LLILTCLVAVALARPK(H)
A <sub>6</sub>	1928.8	2Phospho	(K)DIGSESTEDQAMEDIK(Q)
A <sub>7</sub>	1953.1	1Phospho	(K)YKVPQLEIVPNSAEER(L)
A <sub>8</sub>	2033.1	2Phospho	(K)YKVPQLEIVPNSAEER(L)
A <sub>9</sub>	2081.3	1Phospho	(K)KYKVPQLEIVPNSAEER(L)
A <sub>10</sub>	2161.3	1Phospho	(K)EDVPSERYLGYLEQLLR(L)
A <sub>11</sub>	2250.8	1Phospho	(K)LLILTCLVAVALARPKHPIK(H)
A <sub>12</sub>	2321.3	3Phospho	(K)EDVPSERYLGYLEQLLR(L)
A <sub>13</sub>	2477.6	2Phospho	(K)EPMIGVNQELAYFYPELFR(Q)
A <sub>14</sub>	2519.6	1Phospho	(K)VNELSKDIGSESTEDQAMEDIK(Q)
A <sub>15</sub>	2629.8	2Phospho	(K)YKVPQLEIVPNSAEERLHSMK(E)
A <sub>16</sub>	2709.8	3Phospho	(K)YKVPQLEIVPNSAEERLHSMK(E)
A <sub>17</sub>	2722.4	5Phospho	(K)QMEAESISSSEEIVPNSVEQK(H)
A <sub>18</sub>	2838.0	3Phospho	(K)KYKVPQLEIVPNSAEERLHSMK(E)
A <sub>19</sub>	2909.1	1Phospho	(K)QMEAESISSSEEIVPNSVEQKHIQK(E)

A <sub>20</sub>	3369.6	2Phospho	(K)EGIHAQQKEPMIGVNVQELAYFYPEL FR(Q)
-----------------	--------	----------	--

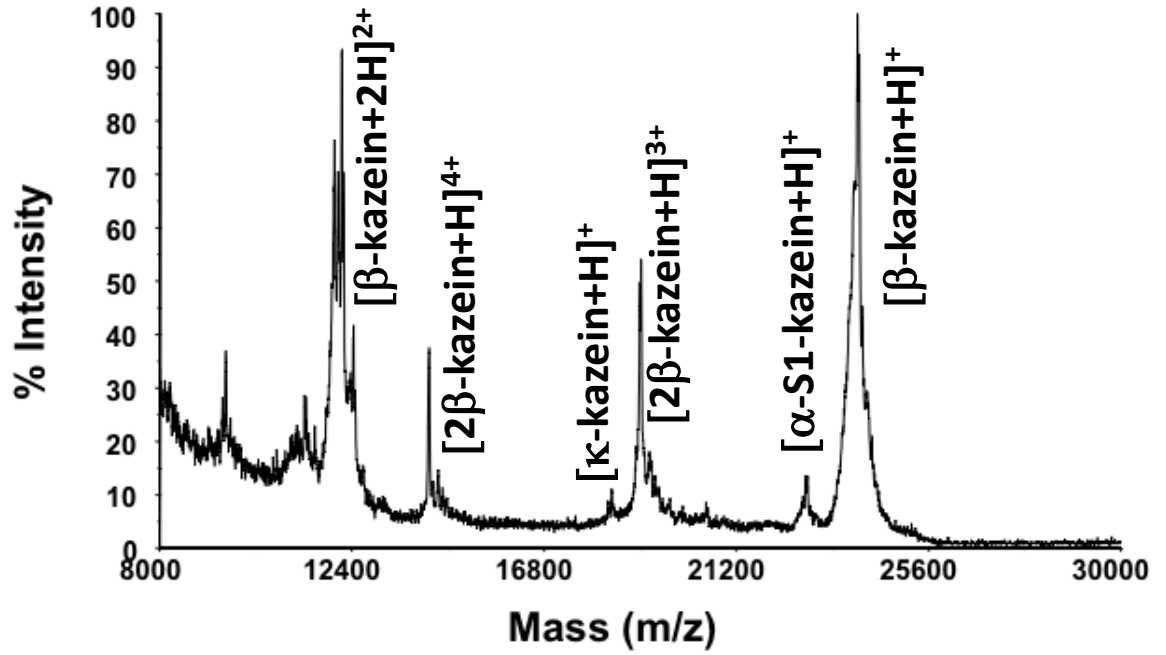
Tablo 8. İnek sütünden gelen alpha S2 proteininden gelen fosfopeptitler

Peptit Simgesi	[M + H] <sup>+</sup>	Modifikasyon	Aminoasit Dizilimi
α <sub>1</sub>	828.8	1Phospho	(K)LTEEEK(N)
α <sub>2</sub>	1138.0	2Phospho	(K)TKLTEEEK(N)
α <sub>3</sub>	1205.2	2Phospho	(K)ENLCSTFCK(E)
α <sub>4</sub>	1266.2	2Phospho	(K)KTKLTEEEK(N)
α <sub>5</sub>	1456.5	1Phospho	(K)KTKLTEEEKNR(L)
α <sub>6</sub>	1460.4	1Phospho	(R)EQLSTSEENSKK(T)
α <sub>7</sub>	1467.5	1Phospho	(K)TVDMESTEVFTK(K)
α <sub>8</sub>	1479.7	1Phospho	(R)YQKFALPQYLK(T)
α <sub>9</sub>	1492.2	3Phospho	(R)EQLSTSEENSK(K)
α <sub>10</sub>	1512.5	2Phospho	(K)RNAVPITPTLNR(E)
α <sub>11</sub>	1547.5	2Phospho	(K)TVDMESTEVFTK(K)
α <sub>12</sub>	1559.6	2Phospho	(R)YQKFALPQYLK(T)
α <sub>13</sub>	1572.2	4Phospho	(R)EQLSTSEENSK(K)
α <sub>14</sub>	1627.4	3Phospho	(K)TVDMESTEVFTK(K)
α <sub>15</sub>	1700.4	4Phospho	(R)EQLSTSEENSKK(T)
α <sub>16</sub>	1714.9	1Phospho	(K)LTEEEKNRNLNFK(K)
α <sub>17</sub>	1755.7	3Phospho	(K)KTVDMEESTEVFTK(K)
α <sub>18</sub>	1835.6	4Phospho	(K)KTVDMEESTEVFTK(K)
α <sub>19</sub>	1883.8	3Phospho	(K)KTVDMEESTEVFTKK(T)
α <sub>20</sub>	1905.0	2Phospho	(K)TVDMESTEVFTKKTK(L)
α <sub>21</sub>	1953.2	1Phospho	(K)KTVDMEESTEVFTKKTK(L)
α <sub>22</sub>	1981.2	1Phospho	(K)NMAINPSKENLCSTFCK(E)
α <sub>23</sub>	2033.1	2Phospho	(K)KTVDMEESTEVFTKKTK(L)
α <sub>24</sub>	2193.1	4Phospho	(K)KTVDMEESTEVFTKKTK(L)
α <sub>25</sub>	2273.1	5Phospho	(K)KTVDMEESTEVFTKKTK(L)
α <sub>26</sub>	2364.7	1Phospho	(R)YQKFALPQYLKTVYQHQQK(A)
α <sub>27</sub>	2412.9	1Phospho	(K)AMKPWIQPKTKVIPYVRYL(-)
α <sub>28</sub>	2589.6	2Phospho	(R)NAVPITPTLNREQLSTSEENSK(K)
α <sub>29</sub>	2620.4	4Phospho	(K)NTMEHVSSEESIISQETYK(Q)
α <sub>30</sub>	2634.8	2Phospho	(K)TVDMESTEVFTKKTKLTEEEK(N)
α <sub>31</sub>	2665.8	1Phospho	(K)RNAVPITPTLNREQLSTSEENSK(K)
α <sub>32</sub>	2676.9	1Phospho	(K)ITVDDKHQKALNEINQFYQK(F)
α <sub>33</sub>	2714.7	3Phospho	(K)TVDMESTEVFTKKTKLTEEEK(N)
α <sub>34</sub>	2717.8	2Phospho	(R)NAVPITPTLNREQLSTSEENSKK(T)
α <sub>35</sub>	2780.4	6Phospho	(K)NTMEHVSSEESIISQETYK(Q)
α <sub>36</sub>	2836.9	3Phospho	(K)ITVDDKHQKALNEINQFYQK(F)
α <sub>37</sub>	2845.8	2Phospho	(K)NTMEHVSSEESIISQETYKQEK(N)
α <sub>38</sub>	2909.5	6Phospho	(R)NAVPITPTLNREQLSTSEENSK(K)
α <sub>39</sub>	2925.8	3Phospho	(K)NTMEHVSSEESIISQETYKQEK(N)
α <sub>40</sub>	2929.2	3Phospho	(R)NANEEYSIGSSSEESAEEVATEEVK(I)
α <sub>41</sub>	2953.9	3Phospho	(K)RNAVPITPTLNREQLSTSEENSKK(T)

$\alpha_{42}$	2985.8	5Phospho	(K)RNAVPITPTLNREQLSTSEENSK(K)
$\alpha_{43}$	3193.9	6Phospho	(K)RNAVPITPTLNREQLSTSEENSKK(T)
$\alpha_{44}$	3254.8	1Phospho	(K)FALPQYLKTVYQHQAAMKPKWIKPKTK(V)
$\alpha_{45}$	3261.5	4Phospho	(K)TVYQHQAAMKPKWIKPKTKVIPYVR(Y)
$\alpha_{46}$	3357.0	6Phospho	(R)EQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKK(T)

Tablo 9. İnek sütündeki kapa proteininden gelen fosfopeptitler

Peptit Simgesi	[M + H] <sup>+</sup>	Modifikasyon	Aminoasit Dizilimi
k <sub>1</sub>	1036.1	1Phospho	(R)FFSDKIAK(Y)
k <sub>2</sub>	2429.6	3Phospho	(R)FFSDKIAKYIPIQYVLSR(Y)



Şekil 17.  $\beta$ -kazein'in sinapirik asit matriksi kullanılarak elde edilmiş pozitif iyon mod MALDI kütle spektrumu

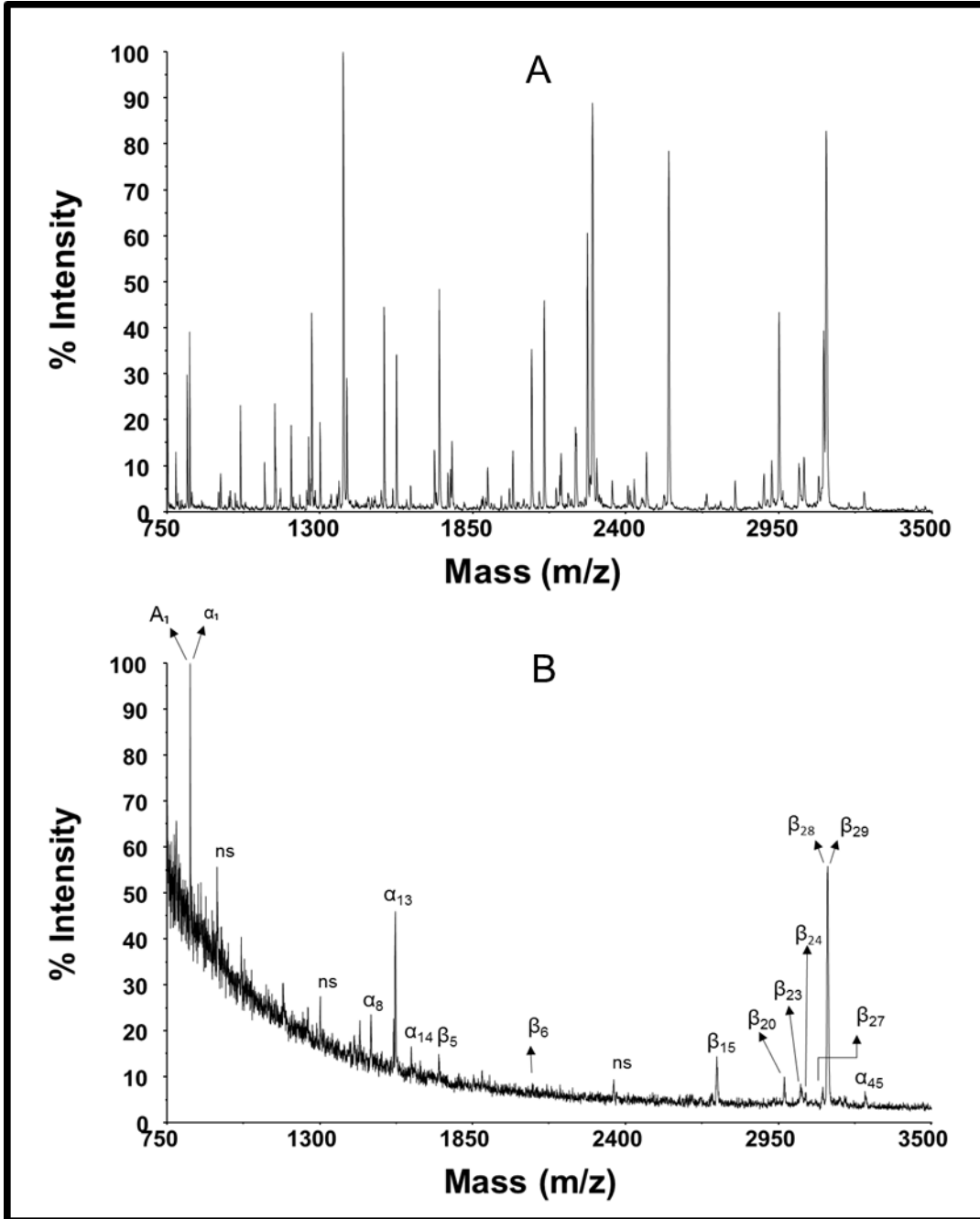
Litürde fosfopeptitler ile ilgili yürütülen çalışmalarda fosfopeptit kaynağı olarak kazein proteini ve alt birimleri tercih edilmektedir. Bu alt birimler içerisinde de fosfopeptit kaynağı olarak en zengin olan alt birim  $\beta$ -kazeindir. Çalışmanın en başında kullanmakta olduğumuz  $\beta$ -kazein proteini MALDI-MS sistemiyle herhangi

bir ön işlem kullanmadan analiz edilmiş ve saflık derecesi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu analizden elde edilen ve Şekil 17'de verilen MALDI kütle spektrumunda  $\beta$ -kazein'e ait  $[M+H]^+$  sinyali oldukça şiddetli bir şekilde gözlenmesine rağmen kazein proteinin diğer alt birimleri olan alfa S1, alfa S2 ve kappa kazein sinyalleri de gözlenmektedir. Bu durumun ticari olarak satılan  $\beta$ -kazein türlerinin tamamında gözlenmektedir. Bunun en önemli nedeni olarak farklı alt birimlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin birbirine yakın olması ve dolayısıyla herhangi bir kimyasal ve fiziksel ayırma yöntemiyle  $\beta$ -kazein'in tamamen saf olarak elde edilememesidir. Dolayısıyla tez çalışmasının bundan sonraki aşamasında yürütülecek olan çalışmalarda fosfopeptit zenginleştirmeler sonrası gözlenen sinyallerin diğer alt birimlere de ait olabileceği değerlendirilmiş ve farklı alt birimlere ait olan fosfopeptitlerin sinyalleri de gözlemlenmiştir.

#### **4.1. $\beta$ -kazein enzimatik parçalanma ürünleri içerisinde yer alan fosfopeptitlerin Poli(NH-AT) hidrojeller kullanılarak zenginleştirilmesi**

Çalışmanın bu aşamasında ilk olarak sentezlenen Poli(NH-AT) hidrojellerinin fosfopeptit zenginleştirilmesindeki etkinlikleri incelenmiştir. İlk olarak  $\beta$ -kazein'in tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltiye sığır serum albümin (Bovine Serum Albumin, BSA) proteinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözelti karıştırılmış ve bu sayede fosfopeptit zenginleştirilmesi için kullanılacak daha karmaşık bir ortamın oluşturulması amaçlanmıştır. Elde edilen çözelti karışımı poli(NH-AT) hidrojelleriyle deneysel kısımda ifade edilen analitik parametreler kullanılarak muamele edilmiş, daha sonra ayrılan hidrojellerden fosfopeptitlerin desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.  $\beta$ -kazein ve BSA proteinlerinin tripsinle parçalanması sonrası elde edilen çözelti karışımlarının MALDI kütle spektrumu (Şekil 18.A) ve Poli(NH-AT) hidrojelleri kullanılarak yapılan zenginleştirme ve desorpsiyon sonrası elde edilen çözeltinin MALDI kütle spektrumu Şekil 18.B'de verilmektedir. Kütle spektrumları incelendiğinde Şekil 18.A'da herhangi bir fosfopeptit sinyaline rastlanmazken Şekil 18.B'de hem  $\beta$ -kazein proteininden gelen fosfopeptitler hem de az miktarda bulunan diğer kazein alt birimlerinden gelen fosfopeptitlerin başarıyla zenginleştirilip tayin edildiği görülmektedir. Bu durum, sentezlenen Poli(NH-AT) hidrojellerin yüksek bir etkinlik ve başarıyla fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılacaklarını göstermektedir. Şekil 18.B'de çok az sayıda, fosfat grubu içermeyen (özgün olmayan, ns) peptit sinyallerine de rastlanmaktadır. Ancak elde edilen kütle spektrumundaki fosfopeptit sinyallerinin

sayısı değerlendirildiğinde ve önceki (Şekil 18.A) spektrumuyla karşılaştırıldığında elde edilen başarı rahatlıkla görülebilmektedir.



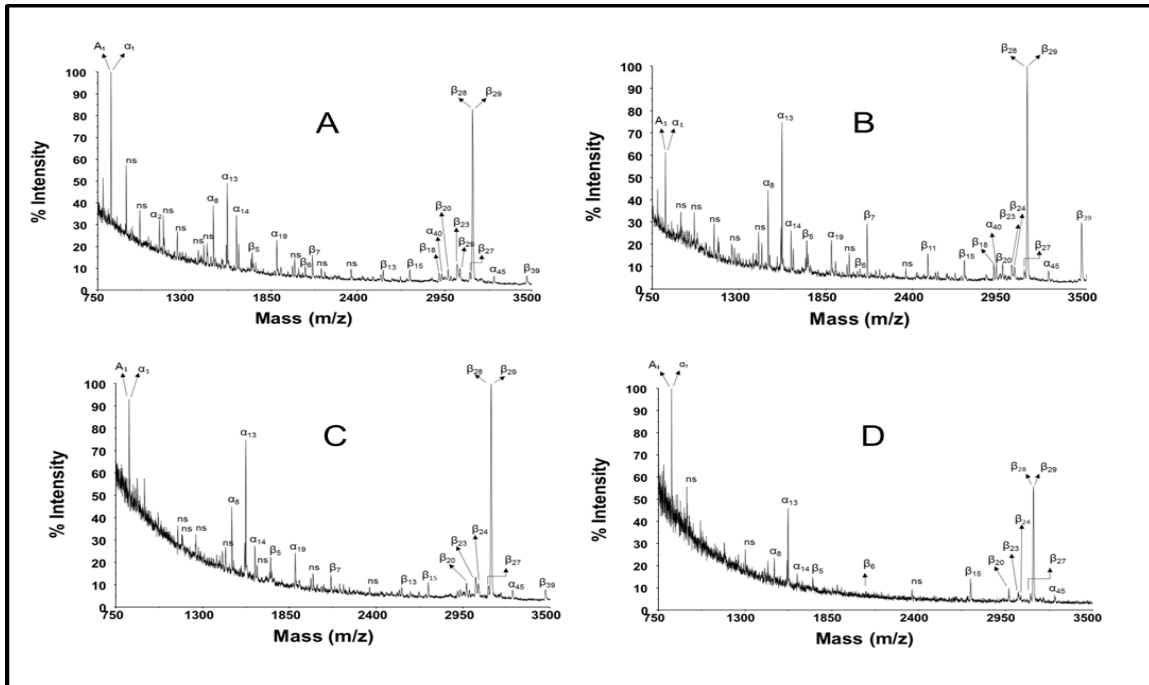
Şekil 18. β-kazein ve BSA proteinlerinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltilerinin karışımlarının (A) MALDI kütle spektrumu ve (B) aynı karışım çözeltisinin Poli(NH-AT) hidrojelleriyle muamele edildikten sonra desorpsiyon çözeltisinin kütle spektrumu.



#### 4.2. Farklı oranlarda 1-allil-2-tiyöüre (AT) içeren hidrojenlerin fosfopeptit zenginleştirmesindeki etkinliklerinin incelenmesi

Poli(NH-AT) hidrojenleri sentez aşamasında molce farklı oranlarda (% 2,5, 5,0, 7,5 ve 10,0 şeklinde) 1-allil-2-tiyöüre (AT) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu AT oranlarının hidrojenin fosfopeptit zenginleştirmesine olan katkısı ve/veya dezavantajları bu aşamada incelenmiştir. Bu amaçla  $\beta$ -kazein ve BSA proteinlerinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltilerinin karışımı farklı oranlarda AT içeren hidrojenlerle muamele edilmiş ve desorpsiyon çözeltileri MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilerek sonuçları Şekil 19'da verilmiştir.

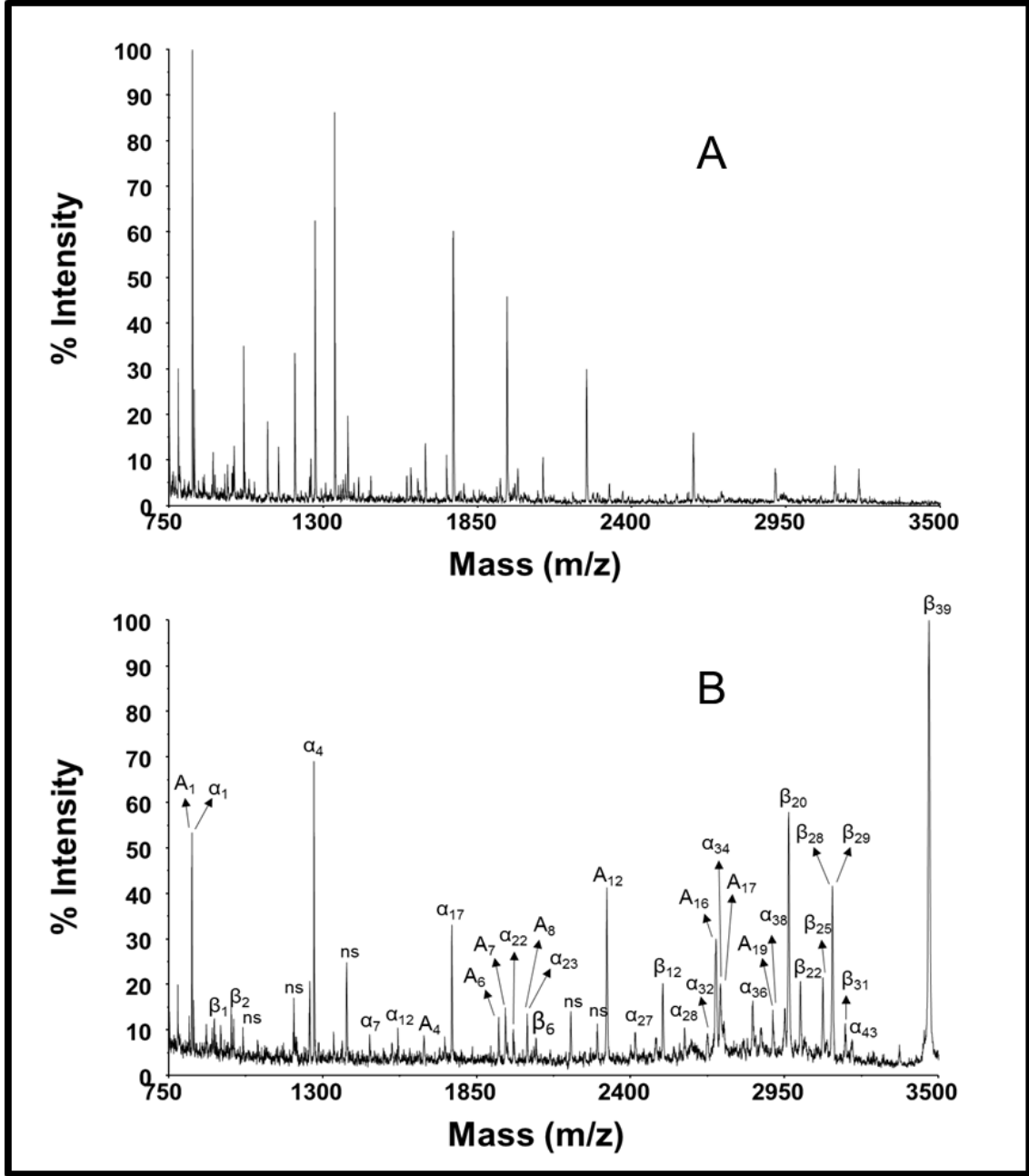
Elde edilen MALDI kütle spektrumları incelendiğinde hidrojenlerin tamamının fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılabilecekleri görülmektedir. Ancak az sayıda AT içeren fosfopeptitlerle yapılan zenginleştirme çalışmalarında fosfopeptitlerin yanı sıra özgün olmayan (ns) peptitlere ait sinyallerin de kütle spektrumlarında gözlemlendiği, AT miktarı arttıkça spesifik olmayan fosfopeptitlerin sinyallerinde azalma olduğu görülmüştür. Bu sonuç hidrojenler içerisindeki AT miktarının fosfopeptitlerin özgün olarak zenginleştirilebilmesinde anahtar rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 19.  $\beta$ -kazein ve BSA proteinlerinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltilerinin karışımlarının farklı oranlarda allil-2-tiyöüre (AT) içeren poli(NH-AT) hidrojenleriyle muamele edilmesi sonrasında elde edilen desorpsiyon çözeltilerinin kütle spektrumları. (A) %2,5, (B) %5,0, (C) %7,5, (D) %10,0 AT içeren hidrojenlerdir.

### **4.3. İnek sütünün tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen peptit çözeltisinden, fosfopeptitlerin Poli(NH-AT) hidrojel kullanılarak zenginleştirilmesi**

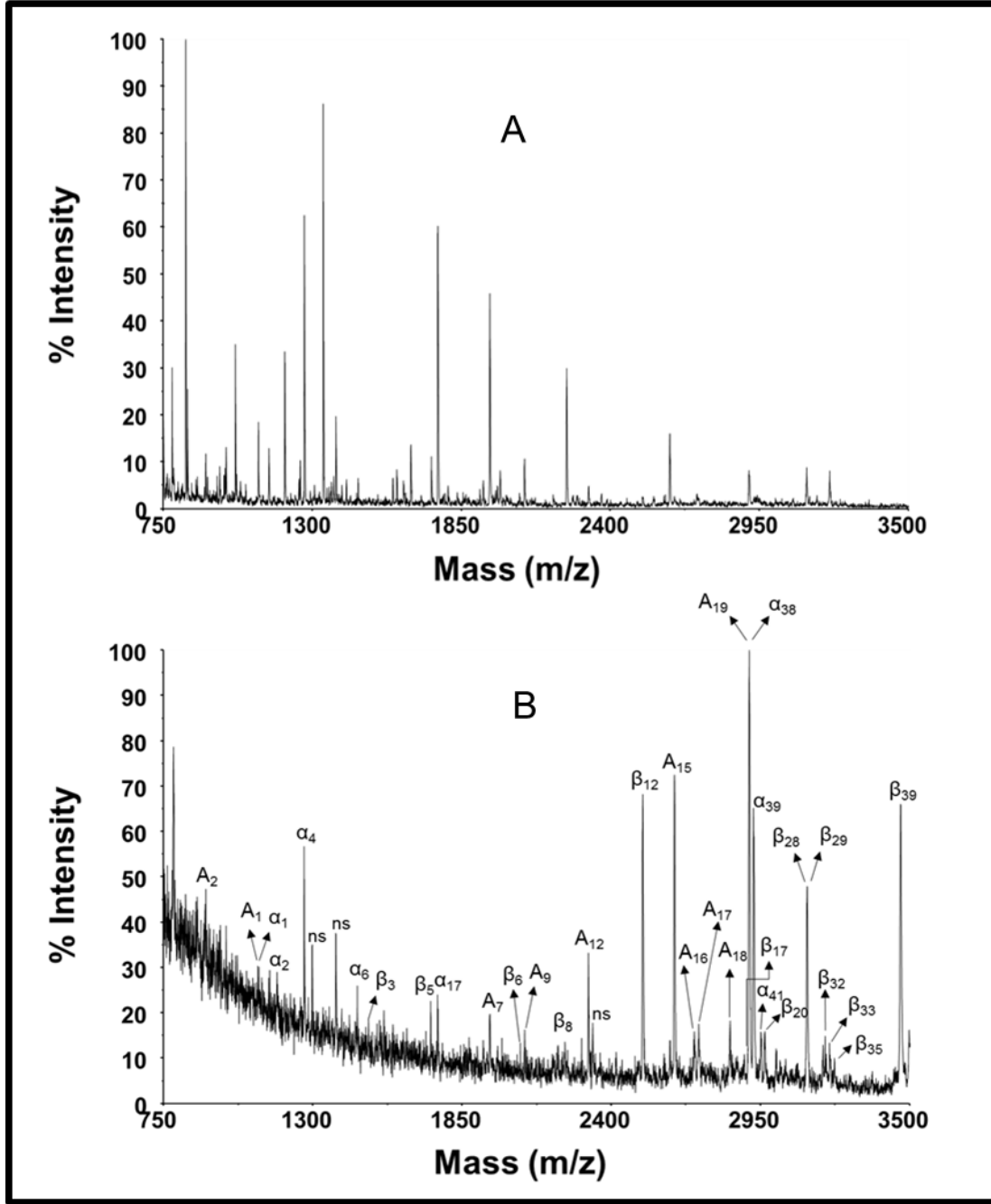
Bilindiği gibi çalışmalarda kullanılan  $\beta$ -kazein proteini ve diğer alt birimler süt proteinleridir. Ancak süt, içerisinde kazein ve alt birimlerinin dışında laktoglobülin, laktalbümin, immünoglobülinler, serum albümin, büyüme hormonu gibi çeşitli proteinlerin yanı sıra A, B6, B12, C, D, K, E vitaminlerini, tiamin, niyasin, biyotin, riboflavin, folatlar ve pantotenik asit gibi bileşikler ve kalsiyum, fosfat, magnezyum, sodyum, potasyum, sitrat, ve klorür gibi çok sayıda mineral ve tuz bileşeni de içermektedir. Bu durum değerlendirildiğinde, herhangi bir süt örneğinin, içerisinden fosfopeptitlerin zenginleştirilmesi amacıyla kullanılacak en karmaşık doğal numunelerden biri olduğu kolaylıkla anlaşılabilir. Bundan dolayı çalışmanın bu aşamasında yerel bir süpermarketten satın alınan yağsız süt numunesi deneysel kısımda ifade edilen analitik metotlar kullanılarak tripsin enzimi ile parçalanmış elde edilen son derece karmaşık çözelti poli(NH-AT) hidrojelleriyle muamele edilerek hidrojellerin gerçek ve karmaşık örnekten fosfopeptitleri zenginleştirme potansiyelleri incelenmiştir. İlk olarak sütün tripsin ile proteolitik parçalanması sonucu elde edilen çözelti MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmiş ve kütle spektrumu Şekil 20A da verilmiştir. Bu MALDI kütle spektrumunda kazein proteininin alt birimlerine ait herhangi bir fosfopeptit gözlenmemiştir. Sonrasında aynı çözeltinin hidrojel ile muamele edilmesi sonrasında elde edilen desorpsiyon çözeltisi MALDI-MS ile analiz edilmiş, elde edilen kütle spektrumunda (Şekil 20.B) birkaç fosfat grubu içermeyen (ns) peptitin yanı sıra çok sayıda fosfopeptitin başarıyla gözlenebildiği görülmektedir. Böylesine karmaşık bir numuneyle gerçekleştirilen zenginleştirme sonrasında bu kadar çok sayıda fosfopeptit sinyalinin gözlenmesi literatürde bugüne kadar görülmemiş bir başarıdır. Bundan dolayı üretilen poli(NH-AT) hidrojellerin bugüne kadar fosfopeptit zenginleştirilmesi amacıyla üretilmiş malzemeler içerisinde en yüksek başarıya sahip zenginleştirme malzemesi olduğu rahatlıkla söylenebilir.



Şekil 20. İnek sütünün tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen çözeltinin (A) Zenginleştirme öncesi MALDI kütle spektrumu ve (B) Poli(NH-AT) hidrojelini kullanarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilmiş MALDI kütle spektrumu.

#### **4.4. İnek sütünün tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen peptit çözeltisinden fosfopeptitlerin Poli(NH-AT) hidrojel doldurularak hazırlanmış pipet ucu kullanılarak zenginleştirilmesi**

Doğal bir örnek olan süt içerisinde fosfopeptitlerin poli(NH-AT) hidrojelleri yardımıyla başarılı olarak gözlenebildiği belirlendikten sonra, bu hidrojellerin kullanım kolaylığını artırmak ve daha etkin bir şekilde kullanabilmek amacıyla, hidrojeller parçalanarak öğütülmüş ve 100 µL hacimli (sarı renkli) pipet ucunun içerisine yerleştirilmiştir. Bu amaçla hidrojellerden öğütülerek elde edilen partikülleri pipet ucu içine sabitlemek için pipetin her iki ucuna da çok küçük miktarda cam pamuğu sıkıştırılmış ve hidrojellerin deneysel işlemler esnasında pipetten dökülmesi engellenmiştir. Sütün tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözelti bu uçların bağlandığı pipet ile çekip bırakılarak uygun pH koşullarında (pH:4) muamele edilmiş ve çözeltide yer alan fosfopeptitlerin pipet ucu içerisindeki hidrojelere tutunması sağlanmıştır. Sonrasında, daha önceki çalışmalarda belirlenen uygun pH değerine sahip desorpsiyon çözeltisi ile muamele edilerek hidrojel yüzeyine bağlı olan fosfopeptitlerin desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve bu çözelti mikro tüp içerisine biriktirilmiştir. Bu işlem sonucunda elde edilen çözelti MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmiş (Şekil 21.B) sonuçlar zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmemiş çözeltinin MALDI kütle spektrumuyla (Şekil 21.A) karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucu poli(NH-AT) hidrojellerinin çözelti içerisinde doğrudan konularak kullanılabilmesinin yanı sıra bir pipet ucu içerisine yerleştirildikten sonra da kullanılacakları görülmüştür. Bu şekilde poli(NH-AT) hidrojellerin çözelti içerisinde yer alan fosfopeptitler ile çok kısa bir süre etkileşmesinin bile zenginleştirme için yeterli olduğunu göstermektedir. Bu sayede fosfopeptit zenginleştirme amacıyla kullanılacak son derece başarılı bir malzemenin yanı sıra, bu malzemenin ticari olarak kullanılabilmesine olanak veren yüksek performanslı bir ürün de geliştirilmiştir.

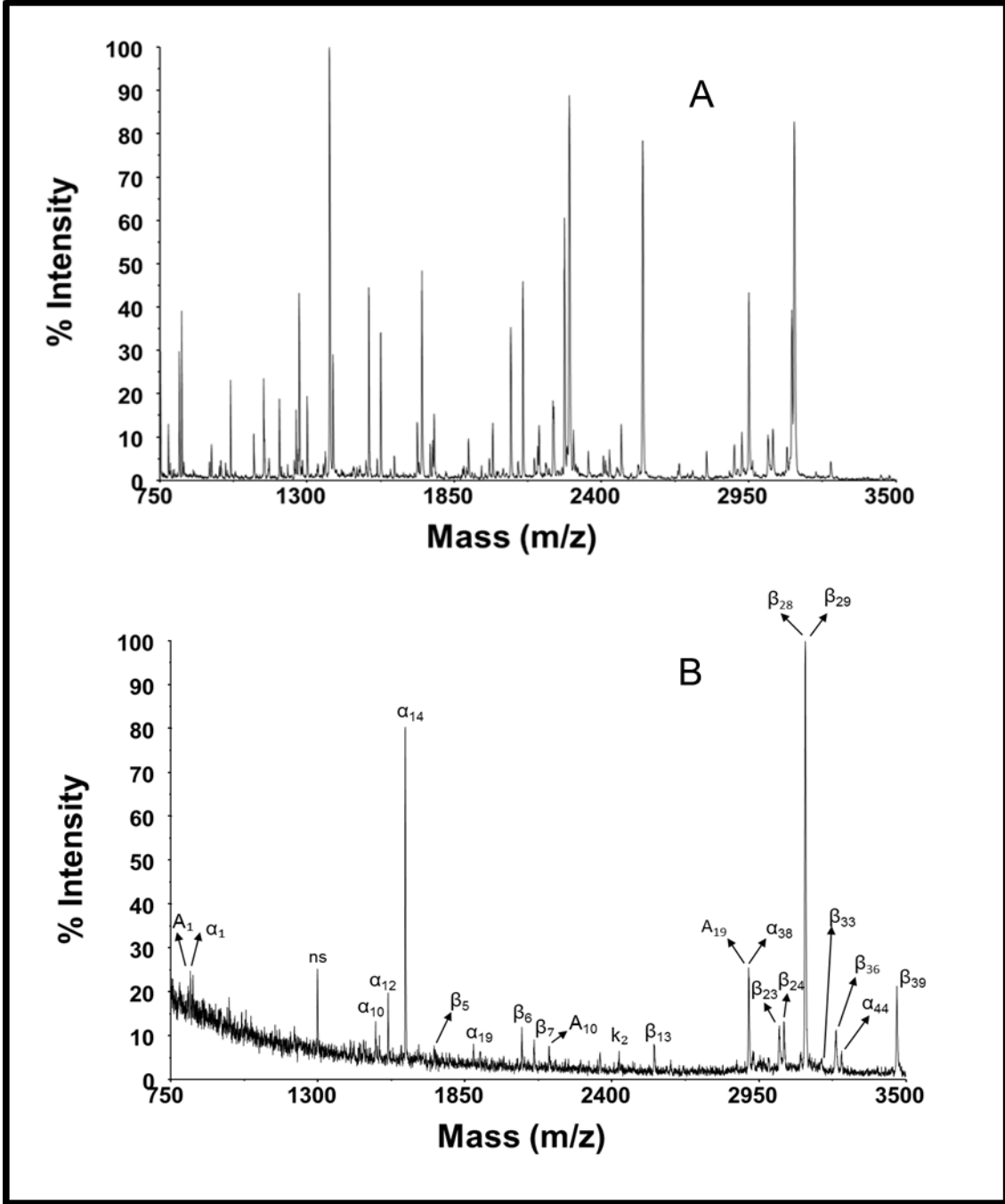


Şekil 21. İnek sütünün tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen çözeltinin (A) Zenginleştirme öncesi MALDI kütle spektrumu ve (B) Poli(NH-AT) hidrojel dolurmuş pipet ucuyla gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilmiş MALDI kütle spektrumu.

#### **4.5. $\beta$ -kazein enzimatik parçalanma ürünleri içerisinde yer alan fosfopeptitlerin amin fonksiyonel gruplarıyla modifiye edilmiş $\text{NH}_2\text{-PS-DVB}$ kullanılarak zenginleştirilmesi**

Çalışmaların bu aşamasında tripsin enzimiyle parçalama sonucunda elde edilen  $\beta$ -kazein proteinine ait peptit çözeltileri, sentezlenmiş olan ve çapraz bağlı olmayan  $\text{NH}_2\text{-PS}$  polimer ile etkileştirilmiştir.

Bu amaçla ilk olarak  $\beta$ -kazein proteinin preteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen peptit çözeltisi herhangi bir işlem gerçekleştirilmeden MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmiş kütle spektrumu Şekil 22.A'da verilmiştir. Sonrasında aynı çözelti  $\text{NH}_2\text{-PS}$  polimerle muamele edilmiş ve zenginleştirme sonrası fosfopeptit sinyallerini gösteren MALDI kütle spektrumu Şekil 22.B'de verilmiştir. Kütle spektrumları incelendiğinde zenginleştirme işleminin büyük bir başarıyla gerçekleştirildiği görülmektedir.

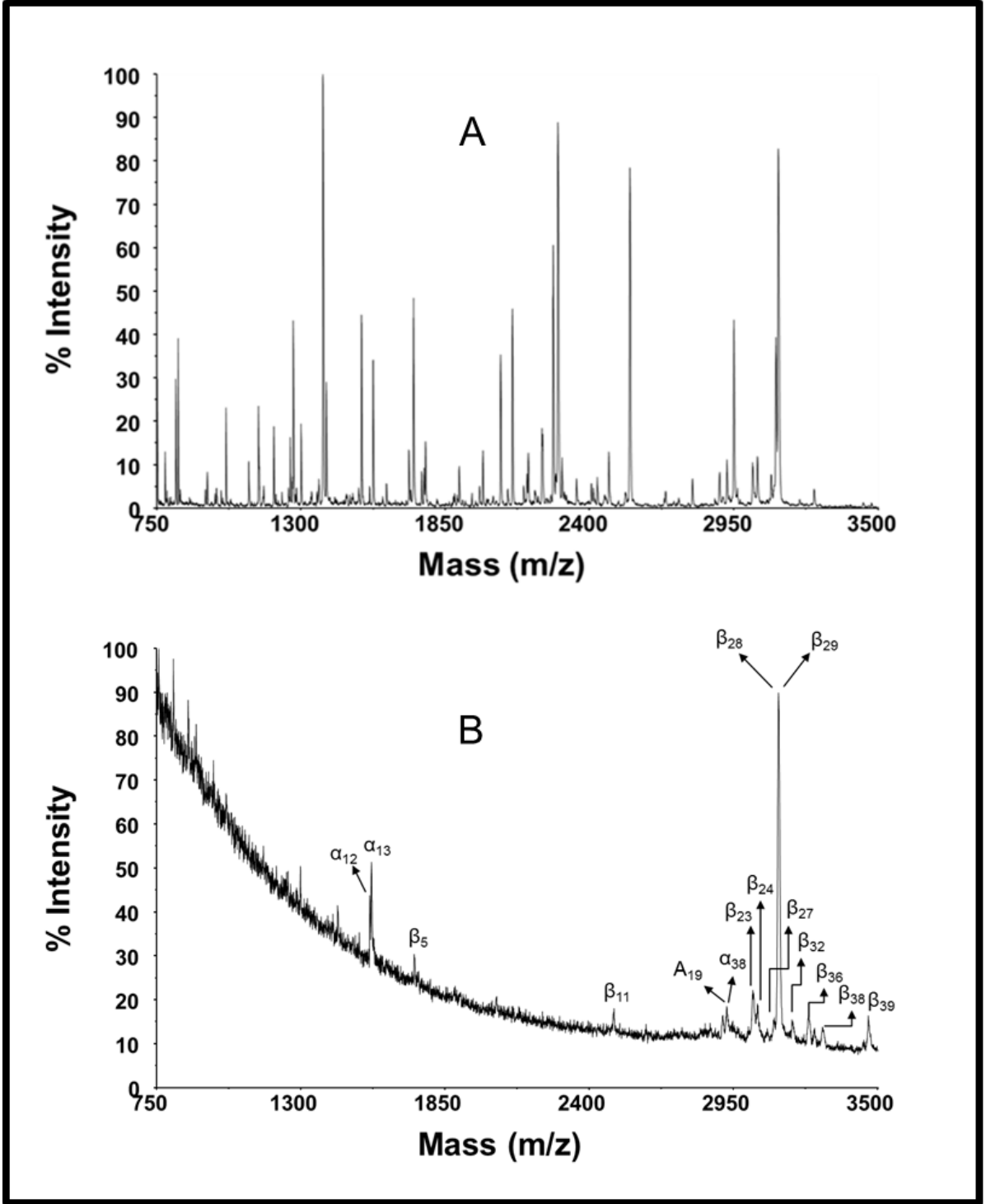


Şekil 22. (A)  $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltinin MALDI kütle spektrumu ve (B)  $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından  $NH_2$ -PS kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumu.

#### **4.6. $\beta$ -kazein enzimatik parçalanma ürünleri içerisinde yer alan fosfopeptitlerin amin fonksiyonel gruplarıyla modifiye edilmiş $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB kullanılarak zenginleştirilmesi**

Tez kapsamında sentezlenen çapraz bağlı olmayan  $\text{NH}_2$ -PS polimerine ek olarak, PSDVB mikrokürelere amin gruplarının bağlanmasıyla elde edilen  $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB polimerleri de fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Bu mikrokürelere çapraz bağlı olmayan türle kıyaslandığında daha az şişme özelliği göstermesinin yanı sıra zenginleştirme sonrasında ortamdaki kolay ayrıştırılabilirlik özelliği de taşımaktadır.  $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB ile zenginleştirme yapılmadan önce  $\beta$ -kazein yine tripsin enzimiyle parçalanmış ve peptit ürünleri MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir (Şekil 23.A). Daha sonra aynı peptit çözeltisi BSA proteininin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen peptit çözeltisi ile karıştırılarak daha karmaşık bir ortam yaratılmış ve bu ortam içerisinde  $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB kullanılarak fosfopeptit zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işlemi sonrasında yapılan MALDI kütle spektrometresi analizi sonucunda elde edilen kütle spektrumu Şekil 23.B’de verilmektedir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında  $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB ile zenginleştirme yapılmadan önce herhangi bir fosfopeptit gözlenmezken, zenginleştirme sonrasında çok sayıda fosfopeptit türünün başarıyla tayin edilebildiği görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar çapraz bağlı olmayan  $\text{NH}_2$ -PS ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında mikroküre formuna sahip malzeme ile daha çok yüksek molekül ağırlığına sahip fosfopeptitlerinin zenginleştirildiği gözlenmektedir. Bunun en önemli sebebi çapraz bağlı olmayan  $\text{NH}_2$ -PS’nin şişmesi sonucu yüzeyde tutunma şansı bulamayan küçük fosfopeptit türlerinin polimerin iç bölgelerine ulaşarak orada müsait olan protone olmuş amin gruplarına bağlanması olarak açıklanabilir. Polimerin şişme özelliğine sahip olmasının zenginleştirme kapasitesi anlamında avantaj sağladığı bu çalışma sayesinde tespit edilmiştir.

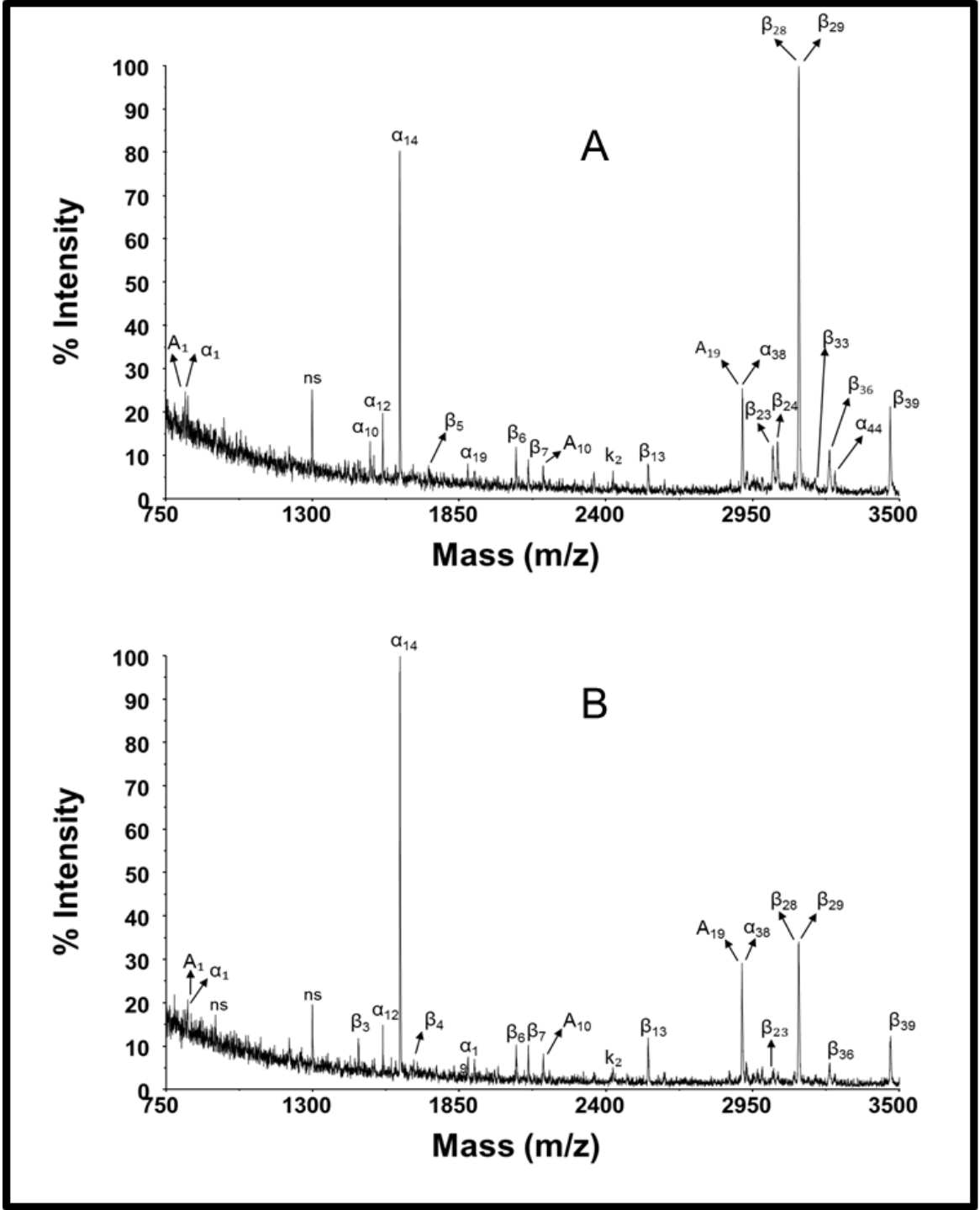




Şekil 23. (A)  $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltinin MALDI kütle spektrumu ve (B)  $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından  $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumu.

#### **4.7. NH<sub>2</sub>-PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında desorpsiyon süresinin zenginleştirmeye etkisi**

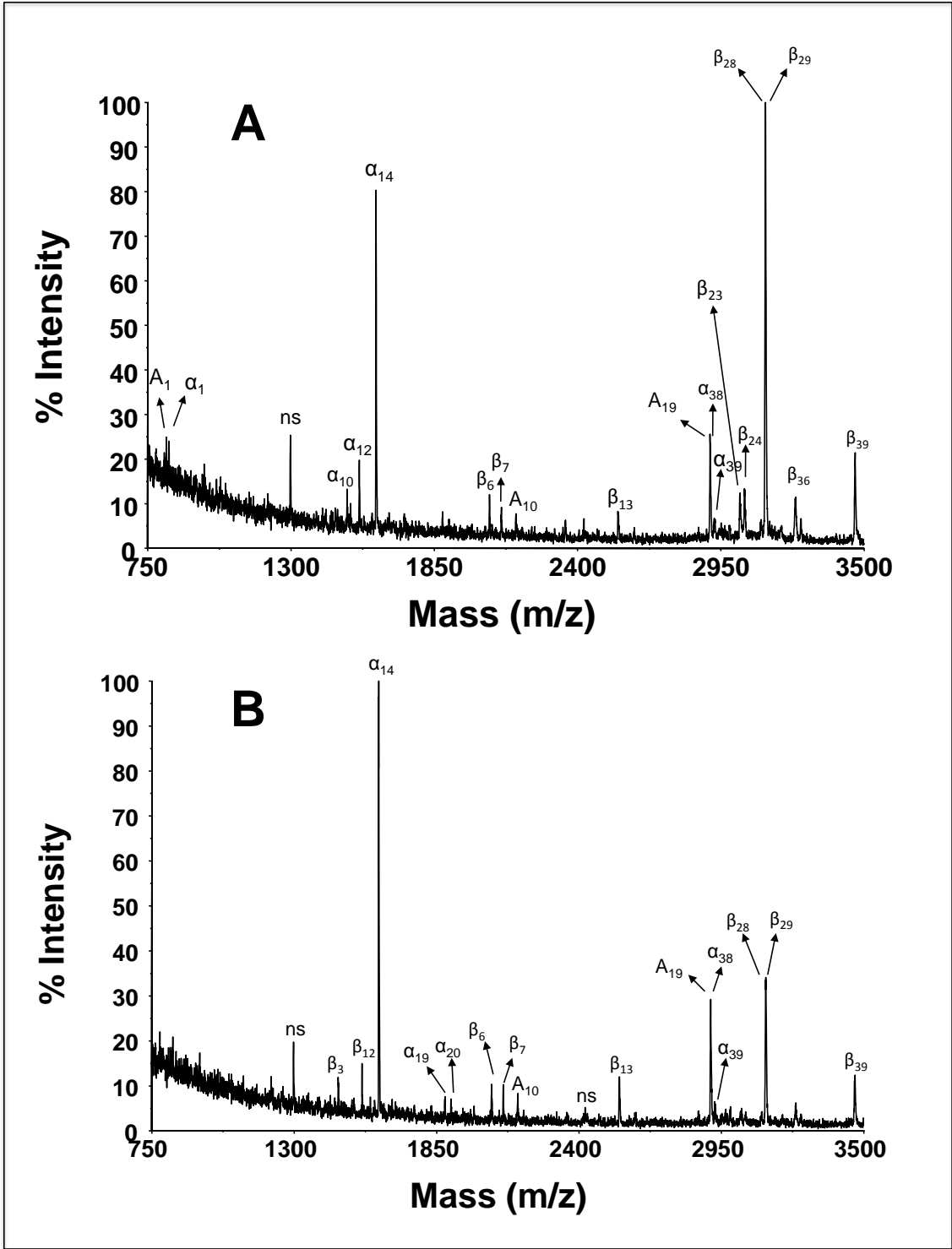
Bu çalışmada çapraz bağlı olmayan NH<sub>2</sub>-PS polimeriyle  $\beta$ -kazein-BSA peptit çözeltisi karışımlarından fosfopeptit zenginleştirilmesi gerçekleştirildiğinde desorpsiyon süresinin zenginleştirme sonuçlarına etkisi incelenmiştir. İlk çalışmada zenginleştirme sonrası, yıkama işlemleri uygulandıktan sonra, hiç beklenmeden desorpsiyon işlemi uygulanmış ve desorpsiyon işlemi için kullanılan çözelti NH<sub>2</sub>-PSDVB polimeriyle muamele edildikten sonra, sadece yaklaşık 1 dakikalık bekleme süresinin ardından polimerden ayrılmış ve MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir (Şekil 24.A). Sonrasında aynı peptit karışımları polimerle muamele edildikten sonra desorpsiyon çözeltisinin polimer ile yaklaşık 30 dk. muamele edilmesi sağlanmış sonrasında desorpsiyon çözeltisiyle polimer ayrıştırılarak çözülden MALDI kütle spektrometresi analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 24.B). Bu sayede desorpsiyon performansındaki değişimler zamana bağlı olarak izlenmeye çalışılmıştır. Ancak elde edilen kütle spektrumları incelendiğinde desorpsiyon işlemi süresinin uzatılmasının fosfopeptit zenginleştirme performansında kayda değer bir değişime sebep olmadığı görülmüştür. Bu durum fosfopeptitlerin geliştirilen analitik metot sayesinde NH<sub>2</sub>-PS polimerinden çok kısa bir zaman içerisinde ayrılabilirdiğini ve uygun bir zenginleştirme işlemi için uzun sürelerle gerek olmadığını göstermektedir.



Şekil 24.  $\beta$ -kazein peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından  $NH_2$ -PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumları. (A) desorpsiyon süresi 1 dk. ve (B) desorpsiyon süresi 30 dk.

#### **4.8. NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında desorpsiyon suresinin zenginleştirmeye etkisi**

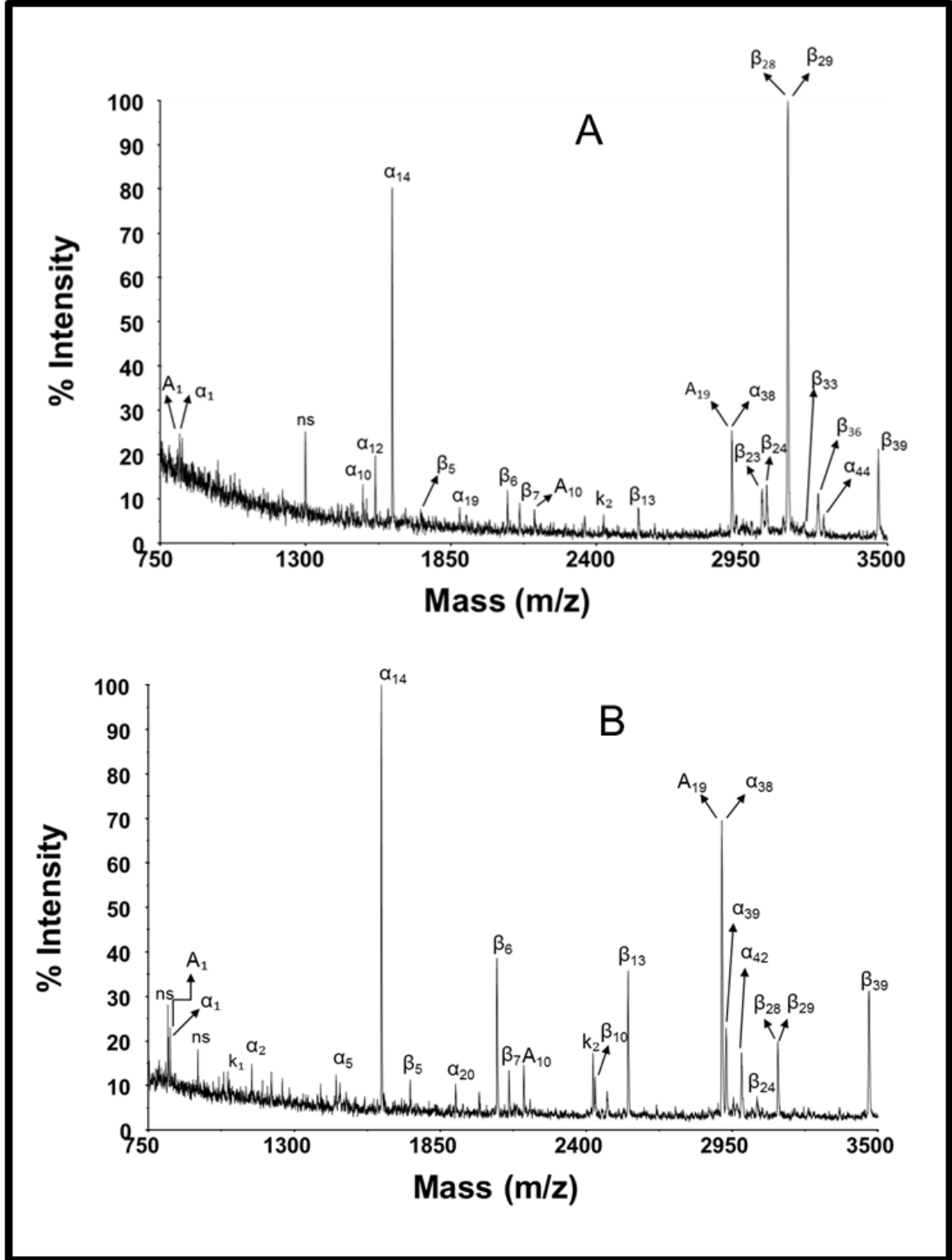
Bu çalışmada ise NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimeriyle  $\beta$ -kazein-BSA peptit çözeltisi karışımlarından fosfopeptit zenginleştirmesi gerçekleştirildiğinde desorpsiyon suresinin zenginleştirme sonuçlarına etkisi incelenmiştir. İlk çalışmada zenginleştirme sonrası, yıkama işlemleri uygulandıktan sonra, hiç beklenmeden desorpsiyon işlemi uygulanmış ve desorpsiyon işlemi için kullanılan özelti NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimeriyle muamele edildikten sonra, hiç beklenmeden (1 dk.) polimerden ayrılmış ve MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir (şekil 25.A). Sonrasında aynı peptit karışımları polimerle muamele edildikten sonra desorpsiyon çözeltisinin polimer ile yaklaşık 30 dk. lık bir muamele suresi sağlanmış sonrasında desorpsiyon çözeltisiyle polimer ayrıştırılarak MALDI kütle spektrometresi analizi gerçekleştirilmiştir (şekil 25.B).



Şekil 25.  $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından  $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumları. (A) desorpsiyon süresi 1 dk. Ve (B) desorpsiyon süresi 30 dk.

#### **4.9. NH<sub>2</sub>-PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında desorpsiyon aşamasında kullanılan asetonitril miktarının zenginleştirmeye etkisi**

Kullanılan malzemelerin tümünde adsorpsiyon aşamasında çözeltiliye bir miktar asetonitril de eklenmektedir. Bu işlem sayesinde peptit çözünürlüklerinin arttığı difüzyonun hızlandığı ve diğer polimerik malzemeler ile zenginleştirme performansının arttığı belirlenmiştir. Ancak desorpsiyon çözeltilisinde yer alan asetonitrilin yarı çapraz bağlı olmayan NH<sub>2</sub>-PS polimerinin şişme kapasitesini azalttığı da gözlenmiştir. Kullanılan NH<sub>2</sub>-PS polimerinin fazla miktarda şişmesi fosfopeptitlerin geri kazanımı için adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerini oldukça zorlaştırmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak, bir miktar daha fazla asetonitril kullanılmasının NH<sub>2</sub>-PS polimerinin şişme oranı düşüreceği ve bu sayede zenginleştirme aşamalarının daha kolay yürütülebileceği düşünülmüştür. Uygulanan bu işlemin zenginleştirme performansına olan etkileri değerlendirmek amacıyla adsorpsiyon ortamına farklı miktarlarda asetonitril eklenerek zenginleştirilmiş fosfopeptit çözeltileri MALDI kütle spektrometrisiyle analiz edilmiştir (Şekil 26.A ve Şekil 26.B). Sonuçlar değerlendirildiğinde adsorpsiyon ortamına daha fazla asetonitril eklenmesinin daha az miktarda gözlenen bazı fosfopeptitlerin sinyallerini kuvvetlendirdiği, fosfopeptit zenginleştirme performansına olumlu katkı yaptığı görülmüştür. Bu nedenle yürütülen çalışmalarda adsorpsiyon çözeltilisi içerisine en uygun miktar olarak 70 µLasetonitril eklenmesine karar verilmiştir.

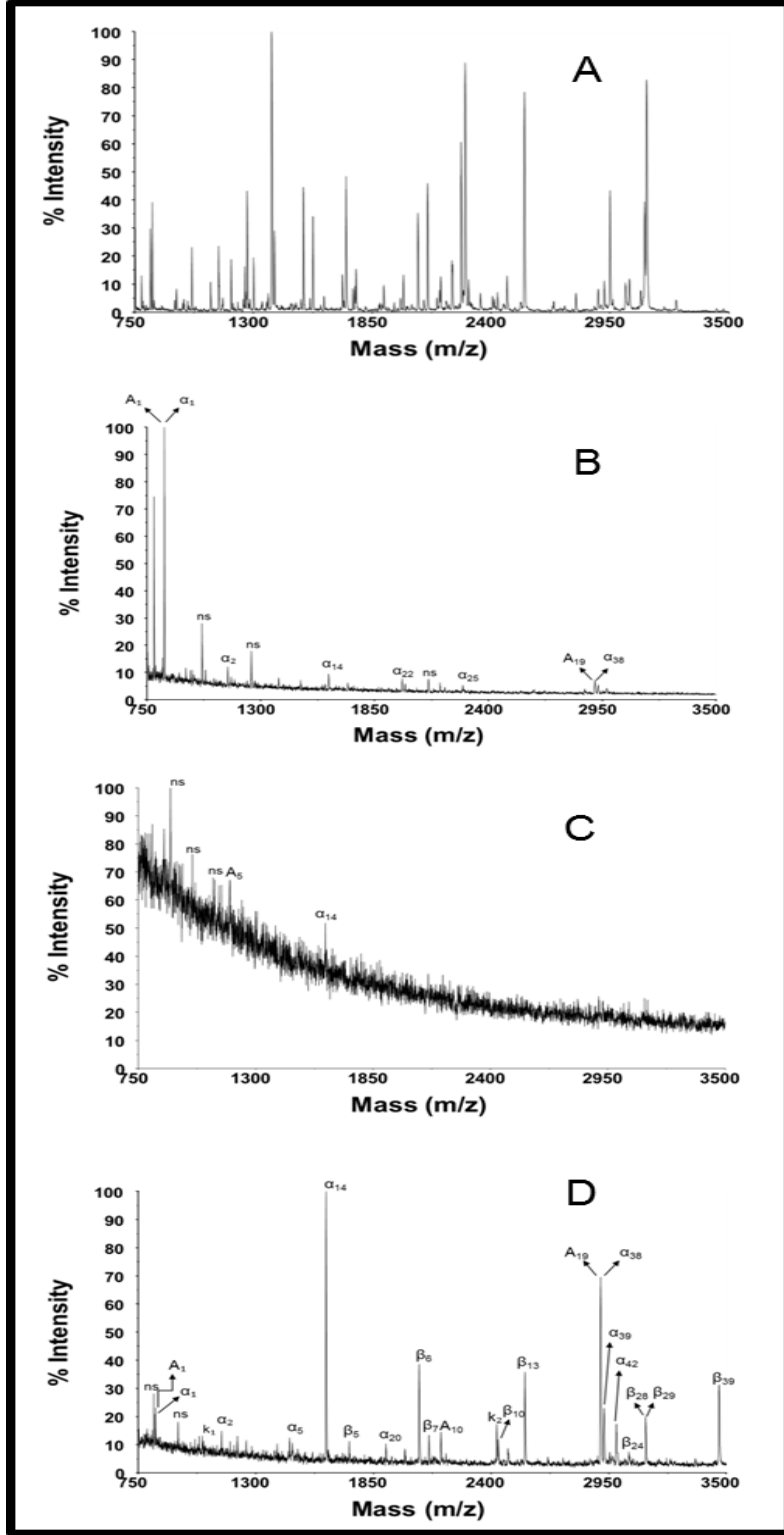


Şekil 26.  $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ve BSA peptit çözeltisi karışımından  $NH_2$ -PS kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirmenin adsorpsiyon basamağında (A) 10  $\mu$ L asetonitril eklenmesi ve (B) 70  $\mu$ L asetonitril eklenmesi sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumları

### **3.10. NH<sub>2</sub>-PS kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında uygulanan yıkama basamaklarının etkinliğinin MALDI-MS ile incelenmesi**

Farklı bir çalışmada NH<sub>2</sub>-PS kullanılarak gerçekleştirilen zenginleştirme metodunda uygulanan adsorpsiyon sonrası yıkama basamaklarının etkinliği incelenmiştir. Bilindiği gibi zenginleştirmenin adsorpsiyon basamağında  $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ile etkileştirilen polimerler sonrasında çözeltilerden ayrıştırılarak yıkama işlemleri gerçekleştirilmektedir. Bu yıkama işlemlerinin amacı çözeltiler içerisinde malzeme yüzeyine bağlanabilecek özgün olmayan peptit türlerinin uzaklaştırılmasıdır. Ancak bu sayede malzemelerin fosfopeptit zenginleştirmesindeki gerçek etkinlikleri tayin edilebilir. Bu amaçla adsorpsiyon ortamından ayrılan NH<sub>2</sub>-PS polimerleri her seferinde taze yıkama çözeltisi kullanılarak 3 defa yıkanmıştır. Şekil 27.A' da verilen MALDI kütle spektrumu zenginleştirme öncesi  $\beta$ -kazeinin peptit sinyallerini göstermektedir. Bu spektrumda herhangi bir fosfopeptit sinyali gözlenmemektedir. Şekil 27.B ve Şekil 27.C'de ilk yıkama ve 3. yıkama çözeltilerine ait MALDI kütle spektrumları verilmektedir. Görüldüğü gibi 3. yıkamanın ardından yüzeyde tutunan hemen hemen hiç özgün olmayan peptit kalmadığı anlaşılmaktadır. Sonrasında NH<sub>2</sub>-PS polimerinden desorpsiyon işlemi gerçekleştirilerek elde edilen fosfopeptit sinyalleri Şekil 27.D'de verilmiştir. Bu sonuçlar zenginleştirilen fosfopeptitler ve NH<sub>2</sub>-PS polimeri arasındaki etkileşimlerin oldukça özgün ve güçlü olduğunu göstermektedir. Bu etkileşimler sadece geliştirilen analitik metodun desorpsiyon basamağındaki koşullar uygulandığında zayıflatılarak istenilen yüksek performansta fosfopeptit geri kazanımı sağlanabilmektedir. Bu sonuç geliştirilen polimerik malzemenin yanı sıra geliştirilerek uygulanan analitik metodun da kalitesinin en büyük göstergesidir.

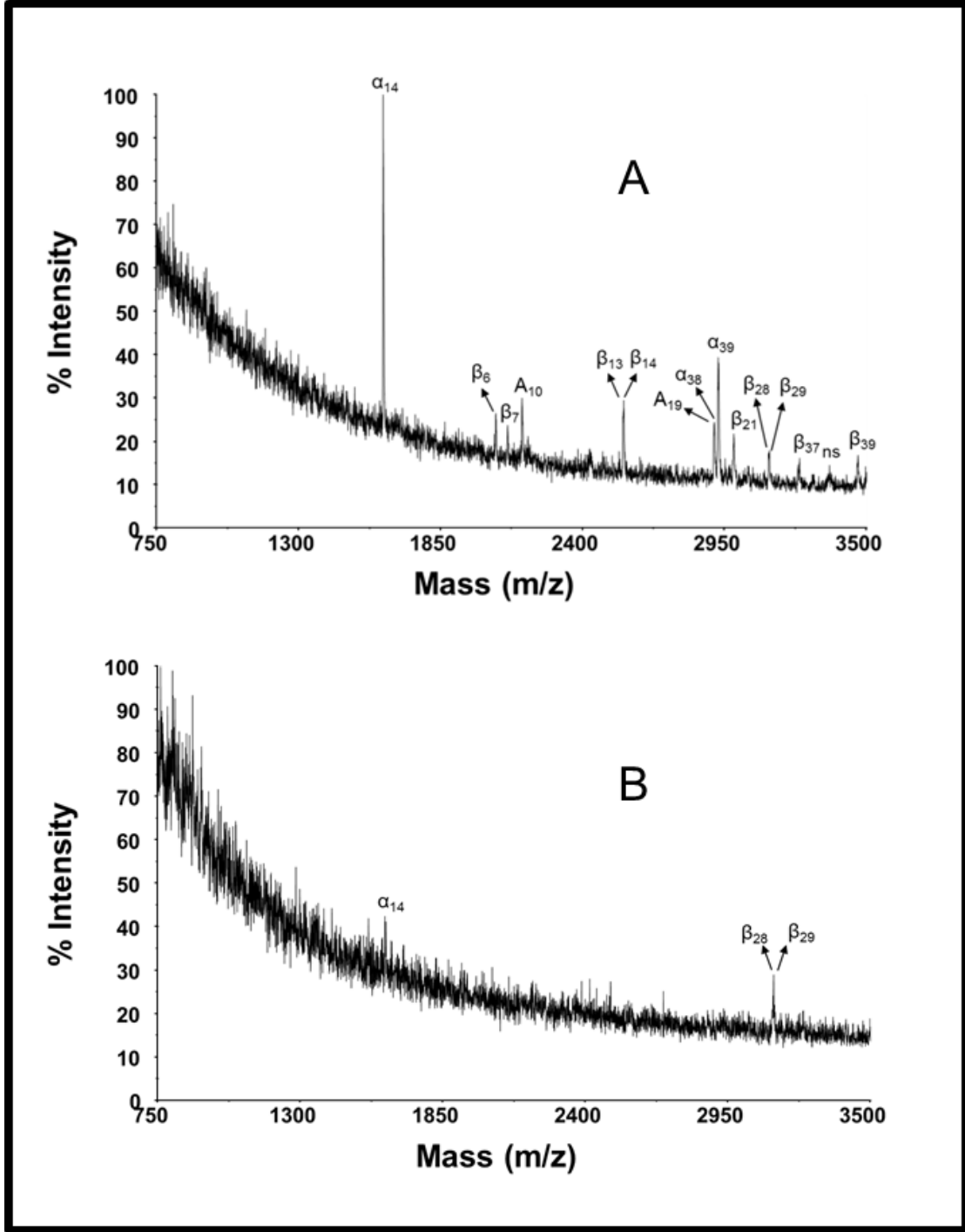




Şekil 27. (A)  $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltisinin zenginleştirme öncesi MALDI kütle spektrumu, (B) zenginleştirme basamağında malzemenin adsorpsiyon sonrası 1. yıkama çözeltisinin MALDI kütle spektrumu, (C) zenginleştirme basamağında malzemenin adsorpsiyon sonrası 3. yıkama çözeltisinin MALDI kütle spektrumu ve (D) desorpsiyon işlemi sonrasında elde edilen çözeltinin MALDI kütle spektrumu.

#### **4.11. NH<sub>2</sub>-PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında ̢-kazein derişiminin zenginleştirme performansına etkisi**

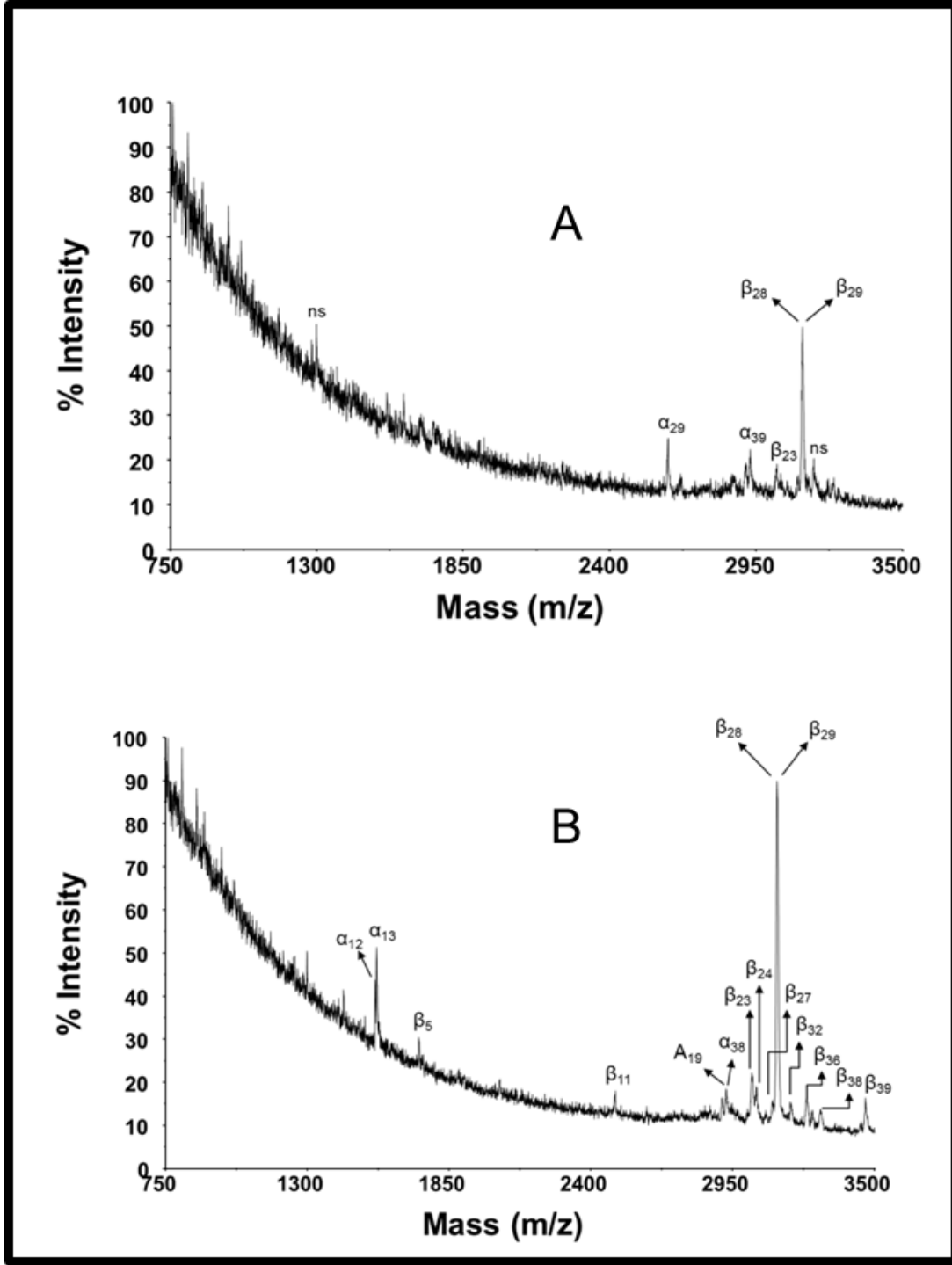
NH<sub>2</sub>-PS polimerleriyle gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ̢-kazein derişiminin polimerin zenginleştirme performansına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 5 femtomol/μL ve 0.5 femtomol/μL derişimlerinde iki farklı ̢-kazein çözeltisi hazırlanmış ve uygun oranlarda reaksiyon bileşenleri kullanılarak tripsin ile parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Parçalama sonucu elde edilen çözelti polimer ile muamele edilerek zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Őekil 28.A ve Őekil 28.B'de verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde zenginleştirme işlemi için 5 femtomol/μL derişimin zenginleştirme performansı konusunda sınır değer olduğu ve bu derişimin altındaki derişimlere sahip fosfopeptitlerin geliştirilen bu malzeme ve analitik metot yardımıyla zenginleştirilemeyeceği belirlenmiştir. Ancak alışmalar neticesinde belirlenen sınır değer kullanım amacına bağlı olarak gerekli olan tayin sınırlarını karşılayan oldukça dūřuk bir seviyedir. Bu nedenle kullanılan malzemenin ve analitik metodun oldukça başarılı bir Őekilde çalıştığı ve önemli zenginleştirme çalışmalarında rahatlıkla kullanılabileceği sōylenbilir.



Şekil 28.  $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltisinin  $NH_2$ -PS ile zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumları. (A) 5.39 femtomol/ $\mu L$  derişime sahip  $\beta$ -kazein ve (B) 0.539 femtomol/ $\mu L$  derişime sahip  $\beta$ -kazein

#### **4.12. NH<sub>2</sub>-PSDVB kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında zenginleştirme öncesinde β-kazeinin peptit çözeltisine karıştırılan BSA peptit çözeltisinin etkisinin incelenmesi**

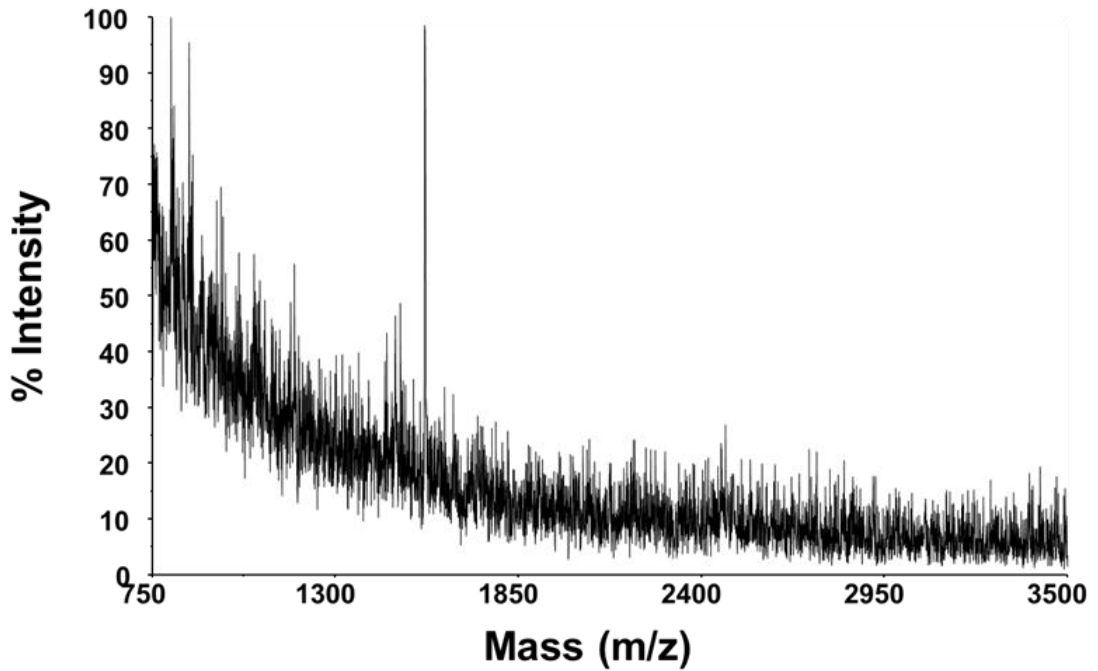
Zenginleştirme performansını daha iyi değerlendirmek ve zenginleştirmenin gerçekleştirileceği çözeltiyi peptit türleri açısından daha karmaşık bir hale getirmek için görece çok daha büyük bir protein olan BSA proteinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözelti, β-kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltisi ile karıştırılmaktadır. BSA peptit çözeltisi karıştırılmadan ve BSA peptit çözeltisi karıştırıldıktan (β-kazein:BSA, 2:3, v:v) sonra çözelti karışımları NH<sub>2</sub>-PS polimeriyle muamele edilmiş adsorpsiyon ve desorpsiyon basamaklarının ardından desorpsiyon çözeltileri MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmişlerdir (Şekil 29). BSA peptit çözeltisinin bulunmadığı MALDI kütle spektrumu (Şekil 29.A) ile BSA peptit çözeltisi eklenerek yapılan zenginleştirme sonrası elde edilen (Şekil 29.B) MALDI kütle spektrumları karşılaştırıldığında BSA peptit çözeltisi eklenmiş karışımdan gerçekleştirilen zenginleştirmenin çok daha başarılı olduğu görülmektedir. Ortam daha karmaşık ve peptit sayısı bakımından daha yoğun olduğunda kullanılan malzemenin performansının arttığı, normalde yüzey üzerine bağlanabilecek özgün olmayan peptitlerin, çözelti içerisindeki BSA peptitlerine bağlı kalarak yüzey ile etkileşmedikleri düşünülmektedir. Bunun dışında çözelti içerisindeki peptit sayısının fazla olması, yüzeyle etkileşmeden çözelti içerisinde kalabilecek fosfopeptitlerin kimyasal potansiyellerini artırarak yüzeye yönelmelerini sağladıkları böylece sadece yüzeyle etkileşim içerisinde olabilecek fosfopeptitlerin kimyasal potansiyellerini düşürmek ve daha kararlı halde bulunmak üzere yüzeyde toplandıkları anlaşılmaktadır. Bu sonuç üretilen polimer malzemelerin karmaşık ortamlarda bile başarıyla çalışacağını ve hatta karmaşık çözeltilerin, polimerin zenginleştirme performansını artırdığını da göstermektedir.



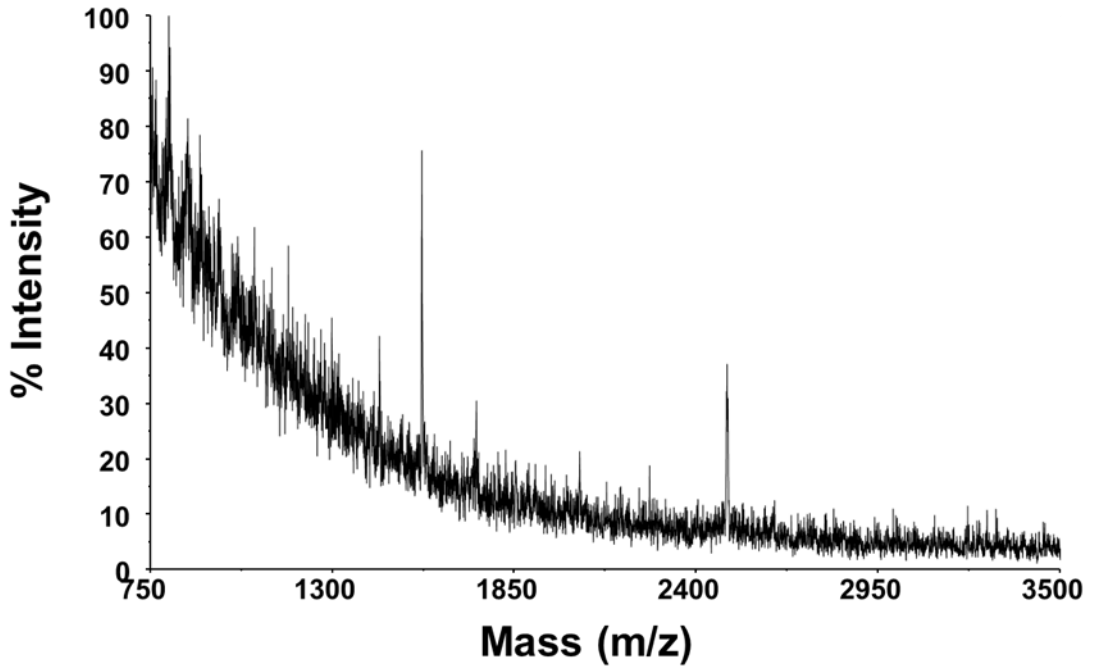
Şekil 29.  $\beta$ -kazeinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltisinin  $\text{NH}_2$ -PS ile zenginleştirme sonrası elde edilen MALDI kütle spektrumları. (A) BSA peptit çözeltisiyle karıştırılmadan yapılan zenginleştirme ve (B) BSA peptit çözeltisiyle karıştırıldıktan sonra yapılan zenginleştirme.

#### 4.13. NH<sub>2</sub>-PS ve NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB ile sadece BSA peptit çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışması

$\beta$ -kazein ile gerçekleştirilen çalışmalara ek olarak, sadece ortamı peptit çözeltileri bakımından biraz daha karmaşık bir hale getirmek amacıyla kullanılan BSA peptit çözeltisiyle de bir takım çalışmalar yürütülmüş, bu kapsamda zenginleştirilen fosfopeptitlerin BSA peptitlerinden gelen peptitler olmadığını gösterebilmek amacıyla NH<sub>2</sub>-PS ve NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimerleri sadece BSA peptit çözeltileriyle etkileştirilmiştir. Bu etkileşimler sonucu elde edilen MALDI kütle spektrumları Şekil 30 ve Şekil 31’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre BSA’ dan kaynaklanan bir kaç özgün olmayan peptit dışında polimerlerin yüzeyine bağlanabilen özgün olmayan peptit türü bulunmadığı, zenginleştirme işlemlerinin oldukça yüksek bir başarıyla sadece  $\beta$ -kazein’e ait fosfopeptitleri kapsadığı görülmüştür.



Şekil 30. BSA peptitlerinin NH<sub>2</sub>-PS malzemesiyle zenginleştirilmesi sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrumu

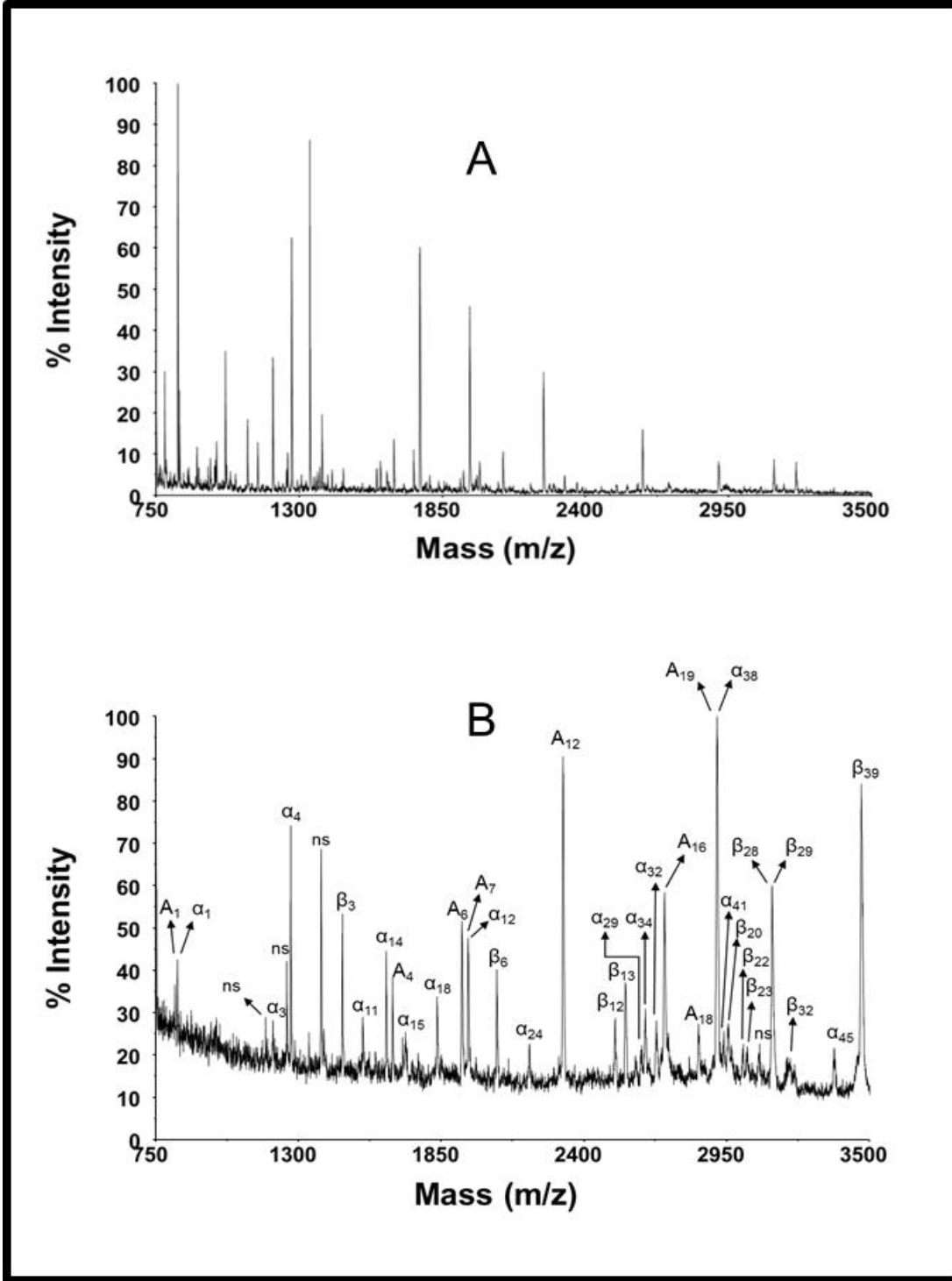


Şekil 31. BSA peptitlerinin NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB malzemesiyle zenginleştirilmesi sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrumu.

#### 4.14. NH<sub>2</sub>-PS ve NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimerleri kullanılarak fosfopeptitlerin doğrudan süt içerisinde zenginleştirilmesi

Bilimsel literatürde bugüne kadar fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılacak yüzlerce organik ve/veya anorganik malzeme önerilmiştir. Çalışma yöntemleri incelendiğinde, önerilen bu malzemelerin üretimlerini takiben karakterizasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği ve standart fosfopeptit çözeltileriyle muamele edilerek zenginleştirme performanslarının değerlendirildiği görülmektedir. Fakat standart çözeltilerle elde edilen sonuçlar, aynı çalışmalar gerçek ve doğal bir numuneyle yürütülmeden çok fazla anlam ifade etmez. Bu amaçla bilimsel literatürde en çok kullanılan gerçek numune türünün süt olduğu görülmektedir. Bu nedenle tez kapsamında, standart  $\beta$ -kazein örnekleri ve bu örneklerin diğer protein çözeltileriyle karıştırılmış kokteyl çözeltileri ile başarılarını kısmen kanıtlayan NH<sub>2</sub>-PS ve NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimerlerinin gerçek bir örnek olan süt içerisinde fosfopeptitleri zenginleştirebilme etkinliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla yağından arındırılmış süt numuneleri tripsin enzimi ile parçalandıktan sonra elde edilen çözeltiler ilk olarak herhangi bir muameleye

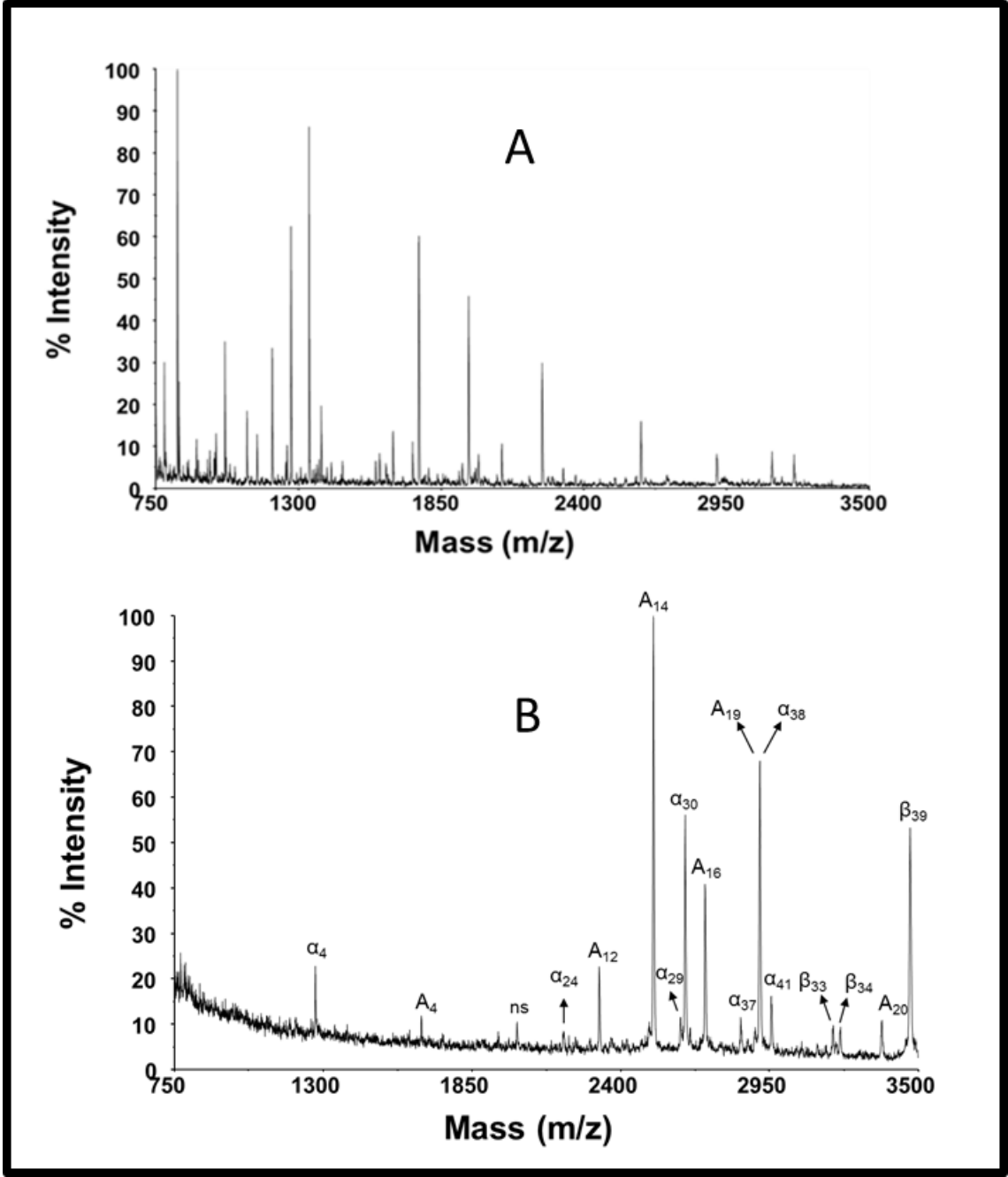
tutulmadan MALDI kütle spektrometresi ile doğrudan analiz edilmiş ve kütle spektrumlarında hiç bir şekilde fosfopeptit izine rastlanmamıştır.



Şekil 32. (A) İnek sütünün tripsinle parçalanma ürünlerini içeren çözeltinin MALDI kütle spektrometresi ile doğrudan analiz edilmiş ve kütle spektrumlarında hiç bir şekilde fosfopeptit izine rastlanmamıştır. (B) sütte ait peptit çözeltisinin  $NH_2$ -PS malzemesiyle zenginleştirilmesi sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrometresi ile doğrudan analiz edilmiş ve kütle spektrumlarında hiç bir şekilde fosfopeptit izine rastlanmamıştır.



Sonrasında tripsin ile parçalanma sonucu elde edilen çözeltiler sırasıyla ayrı ayrı NH<sub>2</sub>-PS ve NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimerleriyle muamele edilmiş ve zenginleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Zenginleştirme sonucunda elde edilen desorpsiyon çözeltileri MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmiş ve sonuçlar sırasıyla NH<sub>2</sub>-PS için Şekil 32.B ve NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB için Şekil 33.B'de verilmektedir. Elde edilen MALDI kütle spektrumları incelendiğinde ve tablolarda verilen fosfopeptitlerle karşılaştırıldığında her iki malzemenin de sadece standart  $\beta$ -kazein çözeltileriyle değil, aynı zamanda süt gibi bir çok moleküllü bünyesinde barındıran oldukça karmaşık bir örnek ile de içinde bulunan  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ -kazein proteinlerinden gelen birçok fosfopeptiti büyük bir oranda zenginleştirebildiği gözlemlenmiştir. Ancak her iki malzemeyle gerçekleştirilen zenginleştirme sonuçları karşılaştırıldığında NH<sub>2</sub>-PSDVB malzemesi tarafından zenginleştirilen ve MALDI kütle spektrumunda görünür hale getirilen fosfopeptit sayısının daha fazla olduğu söylenebilir. Bunun en önemli nedeni NH<sub>2</sub>-PSDVB polimerinin NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimerine nazaran daha çok şişme eğiliminde olması ve benzer fonksiyonel grupları taşımalarına rağmen iç kısımlarda bulunan fonksiyonel gruplarını da şişme özelliği sayesinde aktif bir şekilde kullanılabilmesinden kaynaklanmaktadır. NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB polimerinde bulunan fonksiyonel grupların daha çok yüzey üzerinde yoğunlaşması ve alt katmanlarda bulunan fonksiyonel grupların şişmenin az olmasından dolayı büyük oranda ulaşılmaz olmalarından ötürü dış yüzeydeki fonksiyonel gruplar doygunluğa ulaşarak fosfopeptit zenginleştirme potansiyelini bir miktar kaybetmektedir. Ancak her iki polimerik malzemenin de fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında gerçek örnekler üzerinde yüksek başarı gösterdiği rahatlıkla söylenebilir.



Şekil 33. (A) İnek sütünün tripsinle parçalanma ürünlerini içeren çözeltinin MALDI kütle spektrumu ve (B) süte ait peptit çözeltisinin NH<sub>2</sub>-PSDVB-MB malzemesiyle zenginleştirilmesi sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrumu.

## 5. SONUÇLAR

- Fosfopeptitler için yüksek seçiciliğe sahip olan amin fonksiyonel grupları içeren polimer malzemelerinin fosfospeptit zenginleştirme işlemlerinde başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir.
- Yüzey üzerindeki amin gruplarının pKa değerlerinin yaklaşık 10,0 – 11,0 olduğu bilindiğinden, çalışma esnasında ortamın pH değeri, bu değer altında ve fosfopeptitlerin fosfat gruplarının pKa değerlerinin üstünde tutulmuştur ve ilgili uç grupların ancak bu pH aralığında birbirleriyle etkileşebildikleri görülmüştür.
- Uygun olduğuna karar verilen pH aralığındaki farklı pH değerleri denenmiş ve fosfopeptitlerin adsorpsiyonu için en uygun pH değerinin 4,0 olduğu belirlenmiştir.
- Desorpsiyon esnasında yüzeyde bulunan fosfopeptitlerin negatif yüklü fosfat gruplarının protonlanması ve nötral hale gelerek yüzeyden ayrılmaları sağlanmaktadır. Desorpsiyon işlemi için pH = 2,0 değerinin altındaki ortam koşullarının en uygun koşullar olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre negatif yüklü fosfat gruplarının protonlanabilmesi için ortam pH'ının 2,0'nin altında (fosfat gruplarının pKa değerinin altında) bir değere ayarlanması gerektiği ifade edilebilir.
- Poli(NH-AT) hidrojelleri ile yürütülen zenginleştirme çalışmalarında, hidrojel parçacıklarının öğütülerek kullanılması yani hidrojel yüzey alanının artırılması fosfopeptitlerle daha iyi etkileşebilmesine olanak vermiş ve ayrıca adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerinin daha kısa sürelerde tamamlanmasını sağlamıştır.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda MALDI-MS analizleri için farklı matriks türleri denenmiş ve fosfopeptitlerin etkin bir şekilde iyonlaştırılabilmesi için en uygun matriksin 2,5-dihidroksibenzoik asit matriksi olduğu belirlenmiştir.
- Çalışmada kullanılan  $\beta$ -kazein proteini MALDI-MS sistemiyle herhangi bir ön muamele işlemi kullanmadan analiz edilmiş ve saflık derecesi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu analizden elde edilen MALDI kütle spektrumunda  $\beta$ -kazein'e ait  $[M+H]^+$  sinyali oldukça şiddetli bir şekilde gözlenmesine rağmen kazein proteinin diğer alt birimleri olan alfa S1, alfa S2 ve kapa kazein sinyalleri de

gözlenmektedir. Bu durum ticari olarak satılan  $\beta$ -kazein türlerinin tamamında gözlenmektedir. Bunun en önemli nedeni farklı alt birimlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin birbirine yakın olması ve dolayısıyla herhangi bir kimyasal ve fiziksel ayırma yöntemiyle  $\beta$ -kazein'in tamamen saf olarak elde edilememesidir.

- Farklı oranlarda AT içeren her bir Poli(NH-AT) hidrojel türü kullanılarak elde edilen spektrumlar incelendiğinde hem  $\beta$ -kazein proteininden gelen fosfopeptitler hem de az miktarda bulunan diğer kazein alt birimlerinden gelen fosfopeptitlerin başarıyla tayin edildiği ve fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılabilecekleri görülmektedir. Ancak az sayıda AT içeren fosfopeptitlerle yapılan zenginleştirme çalışmalarında fosfopeptitlerin yanı sıra özgün olmayan (ns) peptitlere ait sinyallerin de kütle spektrumlarında gözlemlendiği, AT miktarı arttıkça özgün olmayan fosfopeptitlerin sinyallerinde azalma olduğu görülmüştür. Bu sonuç hidrojeller içerisindeki AT miktarının fosfopeptitlerin özgün olarak zenginleştirilebilmesinde anahtar rol oynadığını göstermektedir.
- Oldukça karmaşık bir numune olan süt ile gerçekleştirilen zenginleştirme sonrasında bu kadar çok sayıda fosfopeptit sinyalinin gözlenmesi literatürde bugüne kadar gözlenen en iyi başarılarından biridir. Bundan dolayı sentezlenen poli(NH-AT) hidrojellerin bugüne kadar fosfopeptit zenginleştirilmesi amacıyla üretilmiş malzemeler içerisinde en yüksek başarıya sahip zenginleştirme malzemesi olduğu rahatlıkla söylenebilir.
- Yapılan değerlendirmeler sonucu poli(NH-AT) hidrojellerinin çözelti içerisinde doğrudan konularak kullanılabilmelerinin yanı sıra bir pipet ucu içerisine yerleştirildikten sonra da kullanılabilecekleri görülmüştür. Bu şekilde poli(NH-AT) hidrojellerin çözelti içerisinde yer alan fosfopeptitler ile çok kısa bir süre etkileşmesinin bile zenginleştirme için yeterli olduğunu göstermektedir. Bu sayede fosfopeptit zenginleştirme amacıyla kullanılabilecek son derece başarılı bir malzemenin yanı sıra, bu malzemenin ticari olarak kullanılabilmesine olanak veren yüksek performanslı bir ürün de geliştirilmiştir.
- $\beta$ -kazein proteinine ait peptit çözeltileri, sentezlenmiş olan yarı çözünebilir  $\text{NH}_2$ -PSDVB polimeri ve mikroküre formunda olan  $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB polimeri ile de

etkileştirilmiştir. Kütle spektrumları incelendiğinde her iki polimerin de zenginleştirme işleminin büyük bir başarıyla gerçekleştirildiği görülmektedir. Ancak mikroküreler yarı çözünebilir türle kıyaslandığında daha az şişme özelliği göstermesinin yanı sıra zenginleştirme sonrasında ortamdan kolay ayrıştırılabilirlik özelliği de taşıdığı görülmüştür. Buna da bağlı olarak elde edilen sonuçlar yarı çözünebilir  $\text{NH}_2\text{-PS}$  ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında mikroküre formuna sahip malzeme ile daha çok yüksek molekül ağırlığına sahip fosfopeptitlerin zenginleştirildiği gözlenmektedir. Bunun en önemli sebebi yarı çözünebilir  $\text{NH}_2\text{-PS}$ 'nin şişmesi sonucu yüzeyde tutunma şansı bulamayan küçük fosfopeptit türlerinin polimerin iç bölgelerine ulaşarak orada müsait olan protonlanmış amin gruplarına bağlanması olarak açıklanabilir. Polimerin şişme özelliğine sahip olmasının zenginleştirme kapasitesi anlamında avantaj sağladığı bu çalışma sayesinde anlaşılmıştır.

- Farklı desorpsiyon süreleri denenerek elde edilen kütle spektrumları incelendiğinde desorpsiyon işlemi süresinin uzatılmasının fosfopeptit zenginleştirme performansında kayda değer bir değişime sebep olmadığı görülmektedir. Bu durum fosfopeptitlerin geliştirilen malzemeler ve analitik metot sayesinde çok kısa bir zaman içerisinde ayrılabilirliğini ve kaliteli bir zenginleştirme işlemi için uzun sürelere gerek olmadığını göstermektedir.
- Kullanılan malzemelerin tümünde adsorpsiyon aşamasında çözeltiye bir miktar asetonitril de eklenmektedir. Bu işlem sayesinde peptit çözünürlüklerinin arttığı, difüzyonun hızlandığı ve diğer polimerik malzemeler ile zenginleştirme performansının arttığı belirlenmiştir. Kullanılan  $\text{NH}_2\text{-PS}$  polimerinin fazla miktarda şişmesi fosfopeptitlerin geri kazanımı için adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerini oldukça zorlaştırmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak, bir miktar daha fazla asetonitril kullanılmasının  $\text{NH}_2\text{-PS}$  polimerinin şişme oranını düşüreceği ve bu sayede zenginleştirme aşamalarının daha kolay yürütülebileceği düşünülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde adsorpsiyon ortamına daha fazla asetonitril eklenmesinin daha az miktarda gözlenen bazı fosfopeptitlerin sinyallerini kuvvetlendirdiği, fosfopeptit zenginleştirme performansına olumlu katkı yaptığı görülmüştür.
- Bilindiği gibi zenginleştirmenin adsorpsiyon basamağında  $\beta$ -kazeinin peptit çözeltisi ile etkileştirilen polimerler sonrasında çözeltiden ayrıştırılarak yıkama

işlemleri gerçekleştirilmektedir. Bu yıkama işlemlerinin amacı çözelti içerisinde malzeme yüzeyine bağlanabilecek özgün olmayan peptit türlerinin uzaklaştırılmasıdır. Ancak bu sayede malzemelerin fosfopeptit zenginleştirmesindeki gerçek etkinlikleri tayin edilebilir. Görüldüğü gibi 3. yıkamanın ardından yüzeyde hemen hemen hiç özgün olarak bağlanmayan peptit kalmadığı anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar zenginleştirilen fosfopeptitler ve NH<sub>2</sub>-PSDVB polimeri arasındaki etkileşimlerin oldukça özgün ve güçlü olduğunu göstermektedir. Bu etkileşimler sadece geliştirilen analitik metodun desorpsiyon basamağındaki koşullar uygulandığında zayıflatılarak istenilen yüksek performansta fosfopeptit geri kazanımı sağlanabilmektedir. Bu sonuç geliştirilen polimerik malzemenin yanı sıra geliştirilerek uygulanan analitik metodun da kalitesinin en büyük göstergesidir.

- Zenginleştirme işlemi için 5 femtomol/μL derişimin zenginleştirme performansı konusunda sınır değeri olduğu ve bu derişimin altındaki derişimlere sahip fosfopeptitlerin geliştirilen bu malzeme ve analitik metod yardımıyla zenginleştirilemeyeceği belirlenmiştir. Ancak çalışmalar neticesinde belirlenen sınır değeri kullanım amacına bağlı olarak gerekli olan tayin sınırlarını karşılayan oldukça düşük bir seviyedir. Bu nedenle kullanılan malzemenin ve analitik metodun oldukça başarılı bir şekilde çalıştığı ve önemli zenginleştirme çalışmalarında rahatlıkla kullanılabileceği söylenebilir.
- β-kazein peptit çözeltisi ile içine BSA peptit çözeltisi eklenmiş olan karışımdan gerçekleştirilen zenginleştirme karşılaştırıldığında β-kazein-BSA peptit karışımından zenginleştirmenin çok daha başarılı olduğu görülmektedir. Ortam daha karmaşık ve peptit sayısı bakımından daha kalabalık olduğunda kullanılan malzemenin performansının arttığı, normalde yüzey üzerine bağlanabilecek özgün olmayan peptitlerin, çözelti içerisindeki BSA peptitlerine bağlı olarak yüzey ile etkileşmedikleri düşünülmektedir. Bunun dışında çözelti içerisindeki peptit sayısının fazla olması, yüzeyle etkileşmeden çözelti içerisinde kalabilecek fosfopeptitlerin kimyasal potansiyellerini artırarak yüzeye yönelmelerini sağladıkları böylece sadece yüzeyle etkileşim içerisinde olabilecek fosfopeptitlerin kimyasal potansiyellerini düşürmek ve daha kararlı halde bulunmak üzere yüzeyde toplandıkları anlaşılmaktadır. Bu sonuç üretilen polimer malzemelerin karmaşık ortamlarda bile başarıyla çalışacağını ve hatta

kompleks çözeltilerin polimerin zenginleştirme performansını artırdığını da göstermektedir.

- $\beta$ -kazein-BSA karışımı kullanılarak elde edilen çalışmalarda BSA'dan gelen peptitlerin malzemeye tutunmadığını kanıtlayabilmek amacıyla  $\text{NH}_2$ -PSDVB ve  $\text{NH}_2$ -PSDVB-MB polimerleri sadece BSA peptit çözeltileriyle etkileştirilmiştir. Bu etkileşimler sonucu elde edilen MALDI kütle spektrumları incelendiğinde BSA'dan kaynaklanan bir kaç özgün olmayan peptit dışında polimerlerin yüzeyine bağlanabilen peptit türü bulunmadığı, zenginleştirme işlemlerinin oldukça yüksek bir başarıyla sadece  $\beta$ -kazein'e ait fosfopeptitleri kapsadığı görülmüştür.

## KAYNAKLAR

- [1] Çelikbıçak Ö., Atakay M., Güler Ü., and Salih B., A novel tantalum-based sol-gel packed microextraction syringe for highly specific enrichment of phosphopeptides in MALDI-MS applications., *Analyst*, vol. 138, no. 15, pp. 4403–10, August **2013**.
- [2] Desbois-Mouthon C., Danan C., Amselem S., Blivet-Van Eggelpeel M. J., Sert-Langeron C., Goossens M., Besmond C., J. Capeau, and M. Caron, Severe resistance to insulin and insulin-like growth factor-I in cells from a patient with leprechaunism as a result of two mutations in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor, *Metabolism*., vol. 45, no. 12, pp. 1493–1500, **1996**.
- [3] T. Hunter, Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling., *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 225–36, Ocak, **1995**.
- [4] Gadsby D. C. and Nairn A. C., Regulation of CFTR Cl<sup>-</sup> ion channels by phosphorylation and dephosphorylation, *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, vol. 33. pp. 79–106, **1999**.
- [5] Goedert M., Jakes R., Spillantini M. G., Crowther R. A., Cohen P., Vanmechelen E., Probst A., Götz J., and Bürki K., Tau protein in Alzheimer's disease, *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 23, no. 1, pp. 80–86, **1995**.
- [6] Reinders J. and Sickmann A., State-of-the-art in phosphoproteomics, *Proteomics*, vol. 5, no. 16, pp. 4052–4061, **2005**.
- [7] Lim Y. P., Mining the Tumor Phosphoproteome for Cancer Markers, *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 9, pp. 3163–3169, **2005**.
- [8] Mann M., Hendrickson R. C., and Pandey A., Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 70, no. 1. pp. 437–473, **2001**.
- [9] Nelson D. L., Cox M. M., *Biyokimya'nın Temel İlkeleri*, 5. Baskı, (çev: Elçin Y. M.), Palme Yayıncılık
- [10] Çelikbıçak Ö., Atakay M., Güler Ü., and Salih B., A Trypsin Immobilized Sol-Gel for Protein Identification in MALDI-MS Applications, *Anal. Lett.*, vol. 47, no. 4, pp. 707–719, **2014**.
- [11] Witte E. S. S., Old W. M. M., Resing K. A. A., and Ahn N. G. G., Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry, *Nat. Methods*, vol. 4, no. 10, pp. 798–806, **2007**.
- [12] Ruprecht B., Koch H., Medard G., Mundt M., Kuster B., and Lemeer S., Comprehensive and Reproducible Phosphopeptide Enrichment Using Iron Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (Fe-IMAC) Columns, *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 14, no. 1, pp. 205–215, **2015**.
- [13] Kurylo I., Hamdi A., Addad A., Boukherroub R., and Coffinier Y.,



- Comparison of Ti-Based coatings on silicon nanowires for phosphopeptide enrichment and their laser assisted desorption/ionization mass spectrometry detection, *Nanomaterials*, vol. 7, no. 9, **2017**.
- [14] Frawley Cass S. M., Reid G. E., and Tepe J. J., Synthesis of diazo functionalized solid supports and their application towards the enrichment of phosphorylated peptides., *Org. Biomol. Chem.*, vol. 7, no. 16, pp. 3291–9, August. **2009**.
- [15] Atakay M., Çelikbıçak Ö., and Salih B., Use of Sulfonates as Desorption Agents for Phosphopeptide Elution from an Anion-exchange Material, *Anal. Lett.*, vol. 51, no. 5, pp. 760–772, **2018**.
- [16] Ghosh G. and Adams J. A., Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases, *FEBS J.*, vol. 278, no. 4, pp. 587–597, **2011**.
- [17] Atakay M., *MALDI-MS İLE ETKİN FOSFOPEPTİT ANALİZLERİ İÇİN SOL-JEL YÜZEYLERİN GELİŞTİRİLMESİ DEVELOPMENT OF SOL-GEL SURFACES FOR EFFECTIVE PHOSPHOPEPTIDE ANALYSIS BY MALDI-MS*, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [18] Atakay M., Çelikbıçak Ö., Tavşanlı B., and Salih B., MALDI-MS ile fosfopeptitlerin tayininde sol-jel malzemelerin kullanılması ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi, *Anal. Chem. FEBS Lett. Ulus. Kim. Kongresi*, vol. 81, no. 24, pp. 2418–2420, **2009**.
- [19] Feng S., Ye M., Zhou H., Jiang X., Jiang X., Zou H., and Gong B., Immobilized Zirconium Ion Affinity Chromatography for Specific Enrichment of Phosphopeptides in Phosphoproteome Analysis, *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 6, no. 9, pp. 1656–1665, **2007**.
- [20] Salimi K., Usta D. D., Çelikbıçak Ö., Pınar A., Salih B., and Tuncel A., Highly selective enrichment of phosphopeptides by titanium (IV) attached monodisperse-porous poly(vinylphosphonic acid-co-ethylene dimethacrylate) microspheres, *J. Chromatogr. A*, vol. 1496, pp. 9–19, **2017**.
- [21] Ebhardt H. A., Root A., Sander C., and Aebersold R., Applications of targeted proteomics in systems biology and translational medicine, *Proteomics*, vol. 15, no. 18, pp. 3193–3208, **2015**.
- [22] Hoffmann E. D., Stroobant V., *Mass Spectrometry - Principles and Applications.*, vol. 29, no. 6. **2007**.
- [23] Yates III J.R., Mass spectrometry. From genomics to proteomics., *Trends in genetics : TIG*, vol. 16, no. 1. pp. 5–8, **2000**.
- [24] Li L., Xu L., Li Z., Bai Y., and Liu H., Novel nanomaterials used for sample preparation for protein analysis., *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 1, pp. 35–47, Jan. **2014**.
- [25] Gygi S. P. and Aebersold R., Mass spectrometry and proteomics., *Curr.*

*Opin. Chem. Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 489–94, Oct. **2000**.

- [26] Berkenkamp S., Kirpekar F., and Hillenkamp F., Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids, *Science (80- )*, vol. 281, no. 5374, pp. 260–262, **1998**.
- [27] Kaufmann R., Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology, *J. Biotechnol.*, vol. 41, pp. 155–175, **1995**.
- [28] Dale M., Knochenmuss R., and Zenobi R., Two-phase matrix-assisted laser desorption/ionization: Matrix selection and sample pretreatment for complex anionic analytes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 1, pp. 136–142, **1997**.
- [29] Zenobi R. and Knochenmuss R., Ion formation in MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 17, no. 5, pp. 337–366, **1998**.
- [30] Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T., A., *Enstrümantal Analiz İLkeleri*, (çev: Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H.) 1.Baskı, Bilim Yayıncılık