

**SİYALİK ASİT İÇEREN GLİKOPEPTİTLERİN HIZLI VE
ETKİN KÜTLE SPEKTROMETRİK ANALİZLERİ İÇİN
GEÇİŞ METAL OKSİTLERİ KULLANILARAK SEÇİMLİ
OLARAK ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

**SELECTIVE ENRICHMENT OF SIALIC ACID
CONTAINING GLYCOPEPTIDES BY USING
TRANSITION METAL OXIDES FOR RAPID AND
EFFECTIVE MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS**

BURAK TAVŞANLI

Prof. Dr. BEKİR SALİH
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2014

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Burak Tavşanlı'nın hazırladığı 'Siyalik Asit İçeren Glikopeptitlerin Hızlı ve Etkin Kütle Spektrometrik Analizleri için Geçiş Metal Oksitleri Kullanılarak Seçimli Olarak Zenginleştirilmesi' adlı bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Başkan

.....

Prof. Dr. Bekir SALİH

Üye (Danışman)

.....

Prof. Dr. Belma IŞIK

Üye

.....

Doç. Dr. Gökhan DEMİREL

Üye

.....

Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

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

beyan ederim.

...../...../.....

Burak TAVŞANLI

*To science,
enlightening us...*

ÖZET

SIYALİK ASİT İÇEREN GLİKOPEPTİTLERİN HIZLI VE ETKİN KÜTLE SPEKTROMETRİK ANALİZLERİ İÇİN GEÇİŞ METAL OKSİTLERİ KULLANILARAK SEÇİMLİ OLARAK ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

BURAK TAVŞANLI

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. BEKİR SALİH

Ocak 2014, 90 sayfa

Proteinler, çeşitli biyolojik fonksiyonları gerçekleştirmek ve bu fonksiyonları düzenlemek adına çeşitli değişikliklere uğramaktadırlar. Post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) olarak adlandırılan bu değişiklikler, birçok hücrel önemli faaliyetleri yürüttüğünden bu modifikasyonların hücre fonksiyonu içerisindeki rollerinin araştırılması son yıllarda büyük önem kazanmıştır. En sık rastlanan post-translasyonel modifikasyonlardan birisi olan glikozilasyon, hücre içerisindeki enzimatik tepkimeler sonucunda oluşmakta ve O-glikozilasyon ve N-glikozilasyon olmak üzere iki farklı türü bulunmaktadır. Glikozilasyon ile hücreler arası etkileşim ve sinyal iletimi gibi pek çok önemli fonksiyon işlevsel hale gelmektedir. Bu süreçlerin fonksiyonlarında gerçekleşen çeşitli bozulmalar kanser, alkolizm ve benzeri bazı hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir.

Bu tez kapsamında, gadolinyum (III) oksit, titanyum (IV) oksit, tantal (V) oksit, zirkonum (II) oksit, nikel (II) oksit ve demir (III) oksit gibi çeşitli geçiş metal oksitleri kullanılarak saflaştırılan ve zenginleştirilen glikopeptitler, Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırılmalı Kütle Spektrometresi (MALDI-MS) ve Elektrosprey İyonlaşılmalı Kütle Spektrometresi (ESI-MS) ile incelenmiştir. Geçiş metal oksitleri ile glikopeptitler arasındaki etkileşimler, glikopeptit yapılarında yer alan siyalik asit grupları ile pozitif yüklü metal iyonları arasında gerçekleşmiştir. Bu etkileşimler vasıtasıyla glikopeptitler, enzimatik parçalanma sonucu oluşan peptit karışımı içerisinde seçimli olarak ayrılmıştır. Zenginleştirilen glikopeptitler metal oksit yüzeyinden desorplanarak, hızlı ve etkin bir biçimde MALDI-MS ve ESI-MS cihazları ile analiz edilmiştir. Zenginleştirme çalışmaları için en uygun koşulları sağlamak

amacıyla, yükleme tamponu çözeltisi pH'sı, yükleme tamponundaki glikolik asit derişimi ve yıkama çözeltileri bileşenleri farklı bileşen ve oranlarda denenmiş ve en uygun koşullar saptanmıştır. Tezin son aşamasında ise, siyalik asit içeren glikopeptitlerin, peptit bölgelerinin incelenmesi amacıyla peptitlere ait oligosakkarit bölgeleri PNGase F enzimi ile uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde glikolizasyona uğrayan peptideler, zenginleştirme sonrası, kısa zamanda ve doğru bir şekilde tayin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glikoproteomiks, post-translasyonel modifikasyon, glikopeptit zenginleştirme, geçiş metal oksit, MALDI-MS.

ABSTRACT

SELECTIVE ENRICHMENT OF SIALIC ACID CONTAINING GLYCOPEPTIDES BY USING TRANSITION METAL OXIDES FOR RAPID AND EFFECTIVE MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS

BURAK TAVŞANLI

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. BEKİR SALİH

January 2014, 90 pages

Proteins undergo several changes in order to carry out and regulate various biologic functions. These so-called post-translational modifications (PTM) are recently having the most attention as their functionalities proposed to play an important role in many cellular activities. One of the most common post-translational modifications is glycosylation which occurs by enzymatic reactions and yields with two types of modifications; O-glycosilation and N-glycosilation. By glycosylation, many important functions such as intercellular interactions and pulse transmission can become fully operational. Malfunctionalities of these processes are associated with certain diseases like cancer and alcoholism.

Within the scope of this thesis, gadolinium (III) oxide, titanium (IV) oxide, tantalum (V) oxide, zirconium (II) oxide, nickel (II) oxide, and iron (III) oxide are used for purification and enrichment of glycopeptides, and analyzed with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometer (MALDI-MS) and Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS). The interactions between transition metal oxides and glycopeptides are occurred between the sialic acid groups attached on glycopeptides and positively charged metal ions. By means of these interactions, glycopeptides can be selectively separated from a mixture of digested peptides. Enriched glycopeptides are desorbed from transition metal oxide surfaces, and analyzed with mass spectrometric instruments rapidly and effectively. In order to provide the optimum conditions for enrichment studies, pH of the loading buffer, glycolic acid concentration in loading buffer and also components of elution

solutions are changed with different constituents and ratios. Finally, sialic acid containing glycopeptides are treated with PNGase F enzyme for removal of oligosaccharides of these peptides to investigate peptide regions. In this way, glycopeptides were determined in a short time and as an accurate after the pre-concentration of these peptides.

Keywords: Glycoproteomics, post-translational modification, glycopeptide enrichment, transition metal oxide, MALDI-MS.

TEŞEKKÜR

SAREG ailesine 2006 yılında katıldığım andan itibaren, bilimsel ve etik açıdan bana yol gösteren, lisans dönemi zamanımda bile bana laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan, kimyagerlik mesleğini faydalı şekilde kullanmamı öğreten, ben mezun olunca işlerin daha da kolaylaşacağını sanırken bana karşıma çıkan her zorlukta bilgi birikimini paylaşıp yardım eden Prof. Dr. Bekir SALİH'e minnettarım.

Laboratuvarda bulunduğum tüm zamanlarda yardımlarını esirgemeyen, cihaz kullanımı konusunda tüm bildiklerini çekinmeden saatlerce anlatan, MALDI başında saatler harcarken, mavi boyalara bulanmışken bile beraber geçirdiğimiz tüm zamanı neşeli hale getiren Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Yoğun zamanlarında bile, glikoproteomiks alanındaki bilgilerini benimle tereddütsüz paylaşan, veri analizleri sırasında spektrum okyanusunda beraber boğulduğumuz, "gigabytelarca" veri dosyalarını çözümlerken beni hiç yalnız bırakmayan Arş. Gör. Hacı Mehmet KAYILI'ya teşekkür ederim.

Deneyssel veya laboratuvardaki herhangi bir sorunda gece gündüz demeden hemen yardımına koşan ve ileri sürüş teknikleri dersleri için Arş. Gör. Mehmet ATAKAY'a teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında yaptığım tüm dağınıklığa rağmen bana her zaman yardımcı olan Arş. Gör. Ülkü GÜLER ve Funda YILDIRIM'a teşekkür ederim

Benimle birlikte paylaştıkları keyifli laboratuvar ortamı için, Aslı ÇAL, Ayşegül ÖZGEN Selim GERİŞLİOĞLU, Hande KABADAYI, Gizem KAYNAR, Selin ÖZDEMİR ve Canan HÖÇÜK'e teşekkür ederim.

Tez dönemim sırasında bana çok büyük destekleri olan Seda ÇINAR ve Bensu ÖZYAĞCI'ya teşekkür ederim.

Son olarak, doğduğum günden şimdiki zamana kadar yanımdan hiç ayrılmayan, verdiğim her kararın arkasında durarak bana destek olan, sevgili annem Ayşe TAVŞANLI ve sevgili babam Necmettin TAVŞANLI'ya hayatım boyunca ödeyemeyeceğim maddi ve manevi fedakârlıkları için teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
mg	Miligram
M	Molar
mM	Milimolar
pmol	pikomol

Kısaltmalar

AA	Aminoasit
ACN	Asetonitril
APCI	Atmosferik Basıncıta Kimyasal İyonlaşma
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
CI	Kimyasal iyonlaştırma
CID	Çarpışma ile indüklenmiş parçalanma
DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EI	Elektron bombardımanlı
ESI	Elektrosprey iyonlaşmalı
FAB	Hızlı atom bombardımanlı
FT-ICR	Fourier Dönüşümlü İyon Siklotron Rezonans
FWHM	Yarı Yükseklik Değerindeki Genişlik
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LD	Lazer Desorpsiyonu
LIT	Lineer İyon Tuzağı
LTOF	Doğrusal Uçuş Zamanlı
m/z	Kütle / yük
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonlaştırma
MS	Kütle Spektrometrisi

MS/MS	Ardaşık Kütle Spektrometresi
PNGase F	Peptit-N4-(N-asetil-beta-glukozaminil)asparajin amidaz
PTM	Post-translasyonel modifikasyon
QIT	Dört Kutuplu İyon Kapanı
Q-TOF	Dört Kutuplu-Uçuş Zamanlı
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
RP-LC	Ters Faz Sıvı Kromatografisi
SWIFT	Dalga Hali-Muhafazalı Ters Fourier Dönüşümlü
TFA	Trifloroasetik asit
TOF	Uçuş zamanlı
1DE	Tek Boyutlu Elektroforez

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Proteomiks	5
2.1.1. Proteomiksin Çalışma Alanları	7
2.1.1.1. Protein Karışımları İçin Ayırma Yöntemleri	7
2.1.1.1.1. İki-Boyutlu Jel Elektroforez	8
2.2. Proteomların Kütle Spektrometrik Analizi	9
2.2.1. Yukarıdan Aşağıya ve Aşağıdan Yukarıya Yaklaşımlar	9
2.3. Protein ve Peptitlerin Post-Translasyonel Modifikasyonları (PTM)	11
2.3.1. Glikoproteomiks	11
2.3.1.1. Glikopeptitlerin Karakterizasyonu	13
2.3.1.2. Sialik Asit (N-asetilneuraminik asit)	14
2.3.1.3 Glikopeptitlerin Zenginleştirilmesi	15
2.4. Kütle Spektrometrisi	16
2.4.1. Çalışma Prensipleri	18
2.4.2. Tarihçe	19
2.4.3. İyon Kaynakları	23
2.4.3.1. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşma	23
2.4.3.1.1. MALDI Çalışma Prensipleri	24
2.4.3.1.2. Matriks Seçimi	25
2.4.3.1.3. Örnek Hazırlama	26
2.4.3.2. Elektrosprey (ESI)	26
2.4.4. Kütle Ayırıcıları	27
2.4.4.1. Kuadrupol Kütle Ayırıcısı	30

2.4.4.2. Uçuş-Zamanlı Kütle Ayırıcısı (TOF).....	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	33
3.1. Kullanılan Kimyasallar	33
3.2. Kullanılan Cihazlar	33
3.2.1. pH Metre.....	33
3.2.2. Vorteks	33
3.2.3. Dondurarak Kurutma Cihazı	34
3.2.4. Santrifüj	34
3.2.5. MALDI Kütle Spektrometresi	34
3.2.5.1. MALDI Kütle Spektrometresi Analizleri İçin Örnek Hazırlama	34
3.2.6. HPLC.....	35
3.2.7. ESI Kütle Spektrometresi	35
3.3. Enzimatik Parçalama.....	36
3.4. Glikopeptitlerin Zenginleştirme İşlemi.....	36
3.5. Zenginleştirme Ortamındaki pH'nın Değişim Etkisinin İncelenmesi	37
3.6. Glikolik Asit Derişiminin Değiştirilmesi	37
3.7. Yıkama Çözeltilerinin Değiştirilmesinin Etkisinin İncelenmesi	37
3.8. PNGase F Enzimi İle Parçalama İşlemi.....	38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Transferrin Proteinin Enzimatik Parçalanma Ürünleri	39
4.2. Siyalik Asit Grubu İçeren Glikopeptitlerin Zenginleştirilmesi İçin En Uygun Metal Seçimi	41
4.2.1. Gadolinyum (III) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları	42
4.2.2. Titanyum (IV) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları	44
4.2.3. Tantal (V) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları	45
4.2.4. Zirkonyum (II) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları	46
4.2.5. Nikel (II) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları.....	47
4.2.6. Demir (III) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları	48
4.3. Siyalik Asit Bağlı Glikopeptitlerin Zenginleştirme Çalışmaları için En Uygun pH'nın Belirlenmesi	49
4.4 Glikolik Asit Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi	51
4.5. Zenginleştirme İşlemi Sonrası En İyi Yıkama Çözeltisinin Belirlenmesi	53
4.6. Zenginleştirme İşlemi Sonrası PNGase F Enzimi ile Peptitlerden Şeker Gruplarının Uzaklaştırılması	56

4.7. Farklı Derişimlere Sahip Glikopeptitlerin Zenginleştirilmesi	58
5. SONUÇLAR	61
6. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Aminoasitlerin genel gösterimi	5
Şekil 2.2. Protein konformasyon türleri	6
Şekil 2.3. Proteinlerin çeşitli biyolojik kaynaklardan saflaştırılmasının şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.4. Aşağıdan-Yukarıya ve Yukarıdan-Aşağıya yaklaşım türleri.....	10
Şekil 2.5. Glikoproteinlere oligosakkarit bağlantılarının şematik gösterimi	12
Şekil 2.6. Glikoproteinlerin karakterizasyon basamaklarının şematik gösterimi	13
Şekil 2.7. Hücre membranında bulunan oligosakkarit yapıları	14
Şekil 2.8. Moleküler iyon oluşumunun şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.9. Kütle Spektrometresinin bileşenleri	18
Şekil 2.10. MALDI iyonlaşma prensibinin gösterimi	24
Şekil 4.1. Transferrin proteinin enzimatik parçalanma ürünleri.....	39
Şekil 4.2. Transferrinin proteolitik parçalanma sonucunda peptitlerinin ters faz sıvı kromatografisi kullanılarak ayrılması sonucu elde edilen kromatogramı	40
Şekil 4.3. Transferrin proteinin enzimatik parçalanma sonrası LC-MS/MS analizinde Mascot veritabanı kullanılarak elde edilen protein dizilimi. Kırmızı renkle gösterilenler eşleşmiş peptit birimlerini siyah ile gösterilenler eşleşmemiş peptit birimlerini göstermektedir	40
Şekil 4.4. Transferrin proteini üzerindeki N-glikozilasyon bölgelerinden bağlanmış oligosakkarit grubu. (a) Siyalik asit, (b) Galaktoz, (c) N-asetilglukozamin (d) Mannoza, (e) Fukoz	42
Şekil 4.5. Gadolinyum (III) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.....	43
Şekil 4.6. Titanyum (IV) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.....	44
Şekil 4.7. Tantal (V) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.....	45
Şekil 4.8. Zirkonyum (II) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.....	46

Şekil 4.9. Nikel (II) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.....	47
Şekil 4.10. Demir (III) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.....	48
Şekil 4.11. Demir (III) oksit yüzeyine farklı pH'larda yükleme yapıldıktan sonraki desorpsiyon çözeltilerinin MALDI-MS spektrumları. (A) pH = 0.30, (B) pH = 1.00, (C) pH = 2.00, (D) pH = 3.00, (E) pH = 4.00.....	50
Şekil 4.12. Demir (III) oksit üzerine yükleme yapılan çözeltinin farklı glikolik asit derişimleri ve desorpsiyon sonrası MALDI-MS spektrumları. (A) Glikolik asit olmadan, (B) 1.00 M, (C) 2.00 M, (D) 3.00 M.....	52
Şekil 4.13. Desorpsiyon öncesi farklı yıkama çözeltileri sonrası desorpsiyon çözeltilerinin MALDI-MS spektrumları (A) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki defa ACN:Su:TFA (20:80:0,1, v/v) ile (B) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki defa ACN:Su:TFA (0:100:0,1, v/v) ile (C) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki defa ACN:Su:TFA (100:0:0,1, v/v) ile, (D) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ,bir defa Su:TFA (100:0,1, v/v) ve bir defa ACN/TFA (100:0.1, v/v) ile (E) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ile, bir defa %100 Su ve bir defa %100 ACN ile yıkama	54
Şekil 4.14. (A) Demir (III) oksit ile zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu, (B) Zenginleştirme işlemi sonrası desorpsiyon çözeltisinin, PNGase F enzimi ile etkileşimi sonrası MALDI-MS spektrumu.	57
Şekil 4.15. Transferrin proteininin farklı derişimlerdeki zenginleştirme çözeltilerinin MALDI-MS spektrumları, (A) 10 pmol μL^{-1} , (B) 5 pmol μL^{-1} , (C) 0.10 pmol μL^{-1} ...	58

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Çeşitli protein parçalama ajanları	9
Tablo 2.2. Bazı yaygın kullanılan MALDI matriksleri	25
Tablo 2.3. Kütle spektrometrisinde kullanılan kütle ayırıcısı türleri.....	27
Tablo 2.4. Kütle ayırıcıları ve özellikleri	29
Tablo 3.1. HPLC için gradient ayırma programı	35
Tablo 3.2. ESI-MS analizleri için cihazın çalışma parametreleri.....	35

1. GİRİŞ

Proteomiks terimi ilk kez Marc Wilkins ve arkadaşlarınca 1994 yılında, hücre, doku ve organizmadaki bütün proteinlerin karakterizasyonu şeklinde tanımlanmıştır [1]. Günümüzde ise proteomiks kavramı daha geniş bir ifadeyle, protein çalışmaları ile m-RNA analizleri, genomiks ve hibrit çalışmaları gibi genetik okuma analizlerini birleştirmektedir [2]. Bu şekilde daha kapsamlı bir ifadeyle proteomiks kavramı tanımlandığında, bu başlık altında birçok farklı çalışma alanı bulunduğu görülmektedir. Protein-protein etkileşimleri, protein modifikasyonları, protein fonksiyon ve yer belirleme çalışmaları gibi alt başlıklar, proteomiks ana başlığı altında yer almaktadırlar. Proteomiks çalışmalarının günümüzde öneminin bu derece artması ve mevcut halini almasındaki başlıca etken, genom projesinin sonuçlarının yarattığı bilimsel aydınlanmadır. İnsan gen sayısının sadece 25.000-30.000 civarında olduğunun anlaşılması, canlılık ile ilgili bilginin DNA'nın baz dizilerinde değil de sistemin genel işleyişinde aranması gerektiği gerçeğini ortaya koymuştur [3]. Bu nedenle günümüzde gen sayılarından çok daha büyük sayılarla ifade edilen ve genlerin kodladığı işlevleri yerine getiren proteom kavramı ve protein molekülleri üzerinde yoğunlaşmaya başlanmıştır. Bu noktada proteinleri ve genlerin proteinlerle olan yakın etkileşimlerini inceleyen proteomiks bilim dalı karşımıza çıkmaktadır.

Proteomiks çalışmaları bilim dünyasına, canlı organizmalara ait birçok bilginin yalnızca genom çalışmaları yürütülerek elde edilemeyeceğini göstermiştir. Örneğin canlıların fenotipinden genler değil, proteinler sorumludur. Hastalıklar, yaşlanma ve çevresel etki mekanizmalarının işlevlerinin, yalnızca genom çalışmalarını kullanarak aydınlatılması imkânsızdır. Proteinlerin etkileşim mekanizmaları ve protein modifikasyonları ancak proteomiks çalışmaları yürütülerek belirlenebilir. Proteomiks çalışmalarına bu denli hareketlilik kazandıran başlıca olaylar, translasyon basamağından sonra protein yapısında meydana gelen değişiklikleri ifade eden post-translasyonel modifikasyonlardır [4]. Bu değişikliklerin bu kadar önemli olmaları, başlıca yaşamsal faaliyetlerin oluşumları, ilerleyişleri ve düzenlenmeleri sırasında meydana gelmelerinden kaynaklanmaktadır. Protein yapıları, çoğu kez fonksiyonlarını gerçekleştirmek veya düzenlemek için değişikliğe uğrarlar. Proteinler için birbirinden farklı, 300 kadar post-translasyonel modifikasyon gözlenmiştir. Post-translasyonel modifikasyonlara uğramış proteinler birçok hücresel faaliyeti yönetirler

ve bu yüzden bu modifikasyonların hücre döngüsü mekanizmalarındaki rollerinin incelenmesi önemlidir [5]. Bu değişiklikler, örneğin; sinirsel iletimde görev alan peptitleri aktive etmek için gerekli yapısal ayrılmalar olabilecekleri gibi, lizine metil grubu bağlanması gibi aminoasitlere kimyasal bağlanma şeklinde de olabilirler. Bu değişikliklerin her ikisi de post-translasyonel modifikasyonlar olmalarına rağmen ikinci durum, yani; aminoasitlerdeki kimyasal modifikasyonlar, bu konudaki çalışmalar da ilk akla gelen değişikliklerdir.

Bu modifikasyonların en önemli ve en yaygın görülenlerinden biri glikozilasyondur. Glikozilasyon, hücre içinde enzimatik reaksiyonlar sonucunda oluşur ve kısaca oligosakkarit kısmı anomerik karbon atomu aracılığıyla serin (Ser) ve treonin (Thr) aminoasidinin hidroksil grubuna glikozidik olarak bağlanarak O-bağlı glikozilasyonu ve asparajin (Asn) aminoasidinin amit azotuna N-glikozidik bağıyla bağlanarak N-bağlı glikozilasyonu oluşturmaktadır. Glikozilasyon sayesinde proteinler hücre-hücre etkileşimi, hücre uyarımı, hücre adezyonu ve sinyal iletimi gibi birçok hayati öneme sahip işlevler kazanmaktadırlar. Bu süreçte meydana gelen anormalliklerin çeşitli kanserler ve bazı hastalıklar ile ilişkisi tespit edilmiştir [6]. Bu nedenle glikozilasyona uğramış proteinlerin işlevlerinin tam anlamıyla anlaşılması için yapılarının karakterize edilmeleri gerekmektedir. Kansere yönelik biyobelirteçlerin geliştirilmesinde ve yeni ilaç hedeflerinin bulunmasında bu analizlerin yapılması oldukça önemlidir. Son derece önemli olan bu çalışmalar sonucunda, glikozilasyonla ilgili çalışmaların yapıldığı proteomiks alanı oluşmuştur. Bu alana glikoproteomiks adı verilmektedir.

Geçmişte ilk glikoproteomiks çalışmaları oldukça çaba harcanılan ve zaman alıcı deneysel aşamaları gerektirmekteydi. Genellikle jel elektroforez ve Edman degradasyonu yöntemleri ile glikozilasyon bölgelerinin tespiti yapılmaktaydı. Son yıllarda Matriks-Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırılmalı (MALDI) ve Elektrosprey İyonlaştırılmalı (ESI) gibi yumuşak iyonlaştırma özelliğine sahip iyon kaynaklarının gelişimi sayesinde birçok post-translasyonel modifikasyonun kütle spektrometrisi ile karakterize edilebilmesi proteomiks alanına ivme kazandırmıştır. Glikopeptitlerin veya glikoproteinlerin kütle spektrometrik yöntemlerle analizlerinde en sık karşılaşılan sorun, düşük tayin duyarlılığına ulaşabilmektir. Bir klinik veya doğal örneğin proteolizi sonucu oluşan peptit havuzunda, glikopeptitlerin miktarları diğer sıradan peptitlere göre çok daha düşüktür. Ayrıca glikopeptitlerin kütle spektrometrik

tekniklerle analizlerinde, glikopeptit sinyalleri diğer yüksek iyon verimine sahip diğer peptitler tarafından baskılanmaktadır. Bu nedenle glikopeptitlerin kütle spektrometrik analizler öncesinde karmaşık biyolojik örnekler içerisinde etkin, hızlı ve seçimli olarak zenginleştirilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalar genellikle kovalent olmayan etkileşimleri, elektrostatik etkileşimleri ve antijen-antikor tanıma prensiplerine dayalı zenginleştirmeleri içermektedir. Bu amaçla lektin afinite kromatografisi, hidrofilik jeller ve boyut eleme kromatografisi sıkça kullanılmaktadır. Son zamanlarda titanyum dioksit kromatografisi ve hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) de bu alanda sıkça kullanılmaktadır. Afinite prensipli zenginleştirme yöntemlerinde, zayıf bağlanma veya düşük geri kazanım olasılıklarının mevcut olmasından dolayı bu yöntemlerle alınan sonuçlara şüpheyle yaklaşılabilir. Bu yüzden mevcut yöntemlerin tek başlarına veya birlikte kullanılmaları ve bu konuda yeni yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla yürütülen çalışmalar, bu alanda çalışan bilim adamları tarafından gün geçtikçe daha fazla ilgi görmektedir.

Glikopeptitlerin karakterize edilebilmeleri için kütle spektrometrik sistemin yüksek ayırıcılığa, hassasiyete ve doğruluğa sahip olmaları ve tandem kütle spektrometrisi MS/MS özelliğine sahip olması gerekmektedir. MS/MS sayesinde, glikopeptit olduğu belirlenen bir iyonun, azot gibi bir inert gaz yardımıyla parçalanarak elde edilen daha küçük iyonlarının, ikinci bir kütle analizöründe ayrılması sonucu ana moleküle ait daha küçük iyonların (fragment ions) tayin edilmesi ve ayrıntılı yapı karakterizasyonu mümkün olabilmektedir. MS/MS teknikleri ile glikopeptitin glikozilasyon bölgesi, peptit ve oligosakkarit birimi belirlenmektedir. Bu birimlerin karakterize edilmesi glikozilasyona uğramış proteinlerin işlevlerinin tam olarak aydınlatılması açısından çok önemlidir. Bu nedenle, MS/MS teknikleri glikoproteomiks alanında yapılan kütle spektrometrik çalışmaların vazgeçilemez bir unsurudur.

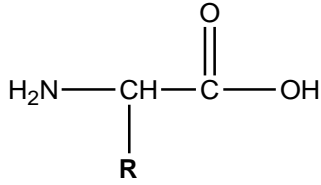
Bu tez kapsamında glikopeptitlerin ileri kütle spektrometrik tekniklerle seçimli, hızlı ve etkin olarak tayin edilebilmesi amacıyla zenginleştirme çalışmalarında kullanılabilecek çeşitli geçiş metal oksitleri denenmiştir. İlk olarak zenginleştirme işlemi öncesi ve sonrasında farklılıkları gözlemlemek için enzimatik olarak parçalanmış transferrin proteini MALDI-MS ve ESI-MS ile analiz edilmiştir. Metal oksit taraması için Zirkonyum (IV) oksit, Tantal (V) oksit, Titanyum (IV) oksit, Nikel

(II) oksit, Gadolinyum (III) oksit ve Demir (III) oksitleri denenmiştir. En iyi zenginleştirme malzemesi olarak demir(III) oksiti belirlendikten sonra en iyi zenginleştirme metodu için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. İlk optimizasyon çalışmalarında yükleme tamponu çözeltisinin pH'ları değiştirilerek adsorpsiyon ile ilişkisi incelenmiş bu aşamadan sonra yükleme tamponun glikolik asit derişimi değiştirilerek siyalik asit içeren glikopeptitlerin yüklenme performansları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Zenginleştirme işlemlerinde önemli bir basamak olan yıkama işlemleri için farklı çözeltiler ile yıkama yapılmış ve en iyi yıkama çözeltisi belirlenmiştir. Son olarak siyalik asit içeren glikopeptitlerin, peptit bölgelerinin belirlenmesi amacı ile peptitlerin PNGase F enzimi ile oligosakkarit bölgeleri uzaklaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Proteomiks

Proteinler doğal halde bulunan 20 tane L- α -aminoasidin özgün dizilimi sonucu oluşan temel biyomoleküllerdir. Proteinler biyolojik süreçler içerisinde hayati önem taşıyan bir role sahiptirler. Bazı proteinler belirli tepkimelerin katalizlenmesi için enzim görevi görürken; diğerleri antikor, reseptör, hormon veya kaslar, kemikler, deri ve saçlar için en önemli bileşen olarak rol almaktadırlar. Ayrıca proteinler küçük moleküllerin taşınmasında, depolanmasında ve sinir uyarılarının iletimini de sağlarlar. Protein zinciri, bir aminoasidin α -karboksilik grubu ile diğer aminoasidin α -amino grubu ile oluşturduğu peptit bağı ile bir arada tutunurlar. Tüm aminoasitler; bir hidrojen atomu, bir amino grubu, bir karboksilik grup ve bir yan zincire bağlı olan merkezi bir karbon atomu içermektedir (Şekil 2.1).

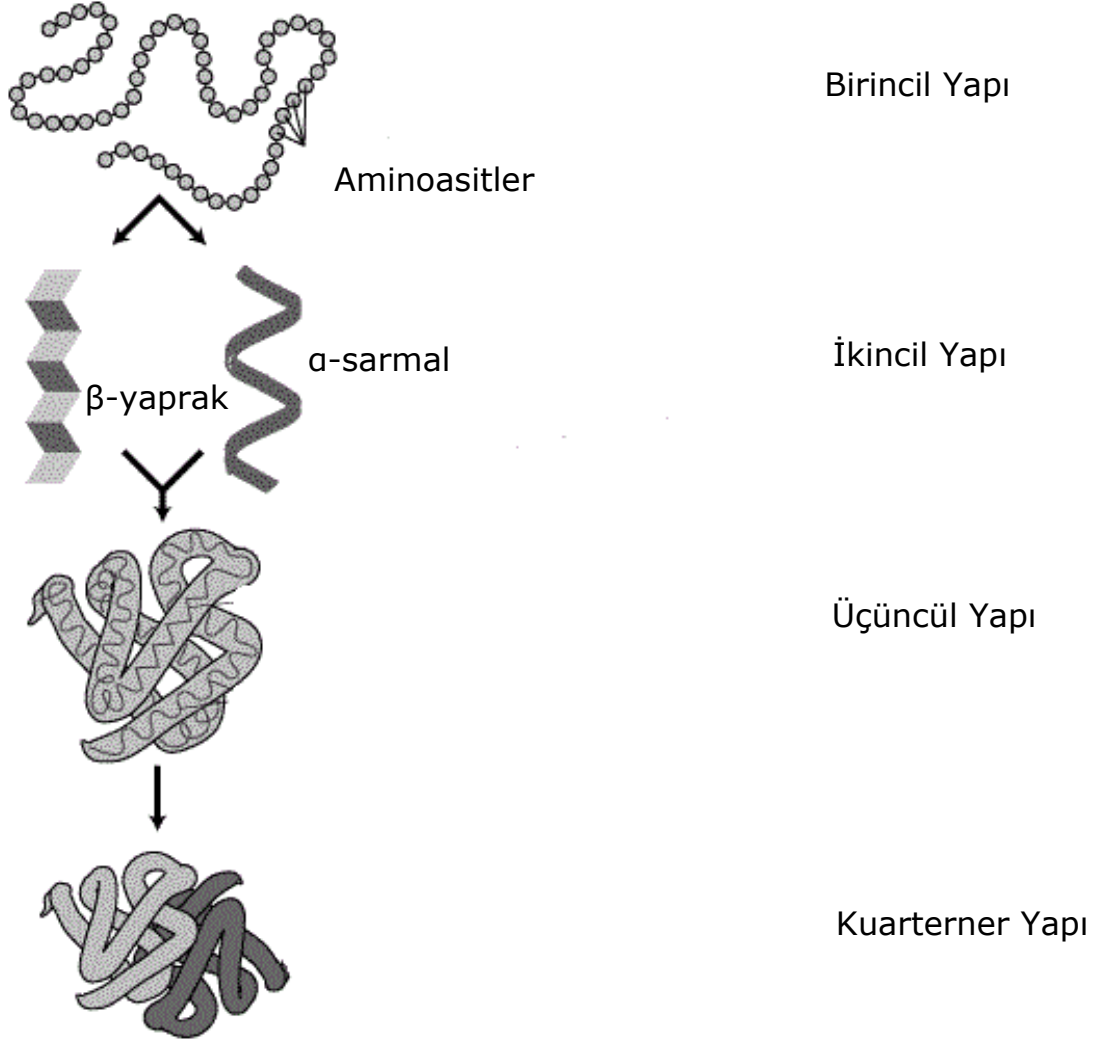


Şekil 2.1. Aminoasitlerin genel gösterimi.

Bir aminoasitin ve dolayısı ile proteinin karakteristik özelliği, sahip olduğu merkezi karbon atomuna bağlı olan yan zincire bağlıdır. Bir protein zinciri serbest amino grubu içeren bir aminoasit (N-sonlu) ile başlarken, serbest karboksilik grup içeren bir aminoasit (C-sonlu) ile sonlanmaktadır. Kesin bir kural olmamakla birlikte, 40 taneden daha az sayıda aminoasit içeren zincirler peptit olarak adlandırılmaktadır.

Proteinler aslında gen ekspresyonunun son ürünüdür. Hücre içerisinde bir proteinin üretimi, genetik bilgilerin genlerden mesajcı RNA'ya (mRNA) transkripsiyonu ile başlamaktadır. Bunun arkasından bu bilginin translasyonunun bir proteine dizilimi belirlenerek gerçekleşmektedir. Taşınma sırasında, proteinler çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara (PTM) uğramaktadır. Bir proteinin konformasyonu, aminoasitlerin 3-boyutlu olarak dizilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bulunduğu ortama bağlı olarak, bir protein dört farklı dizilimde bulunmaktadır [7]: Birincil yapı, aminoasitlerin lineer dizilimini, disülfid bağlarının yerini ve aminoasitlerin diğer kovalent modifikasyonlarını tanımlamaktadır. İkincil yapı, proteinlerin kısa segmentlerinin katlanması ve α -sarmal ve β -yaprak gibi konformasyonların zincir

iskeleti üzerindeki $-C=O$ ve $H-N-$ grupları arasındaki hidrojen bağları ile kararlı hale geçtiklerini açıklamaktadır. Üçüncül yapı, ikincil yapıda bulunan bir protein zincirinin kendi içerisindeki etkileşimleri ile katlanarak 3-boyutlu bir yapıya dönüşmesini tanımlamaktadır. Son olarak kuarterner yapı, birden fazla polipeptit zinciri içeren proteinlerde görülmekle birlikte, bu alt birimlerin polar ve hidrofobik etkileşimler ile bir kompleks oluşturmasını açıklamaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Protein konformasyon türleri.

Proteomiks terimi, bir genomun tüm protein tamamlayıcılarının yapılarını ve fonksiyonlarını inceleyen çalışma alanıdır. Proteom (protein + genom); bir genom, hücre veya dokuya ait proteinlerin tümüdür [1]. Oysaki bir proteom, tek bir genden çok fazla sayıda protein elde edilebileceğinden dolayı, bir genomdan çok daha karmaşıktır.

Proteomiks, hücre içerisinde gerçekleşen olayların açıklanması için çok daha detaylı bir açıklama getirebildiğinden, son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Yaşayan bir sistemin proteomu, ekspresyona tabi tutulan protein türleri, ekspresyon seviyeleri, hücre içi konumu ve post-translasyonel modifikasyon türleri ile son derece dinamik olup sürekli bir değişim halindedir. Bu sebepten ötürü proteom, hücrenin çevresi ve fizyolojik durumu ile yakından ilgilidir, böylelikle hücrenin sağlıklı olup olmadığı anlaşılabilir.

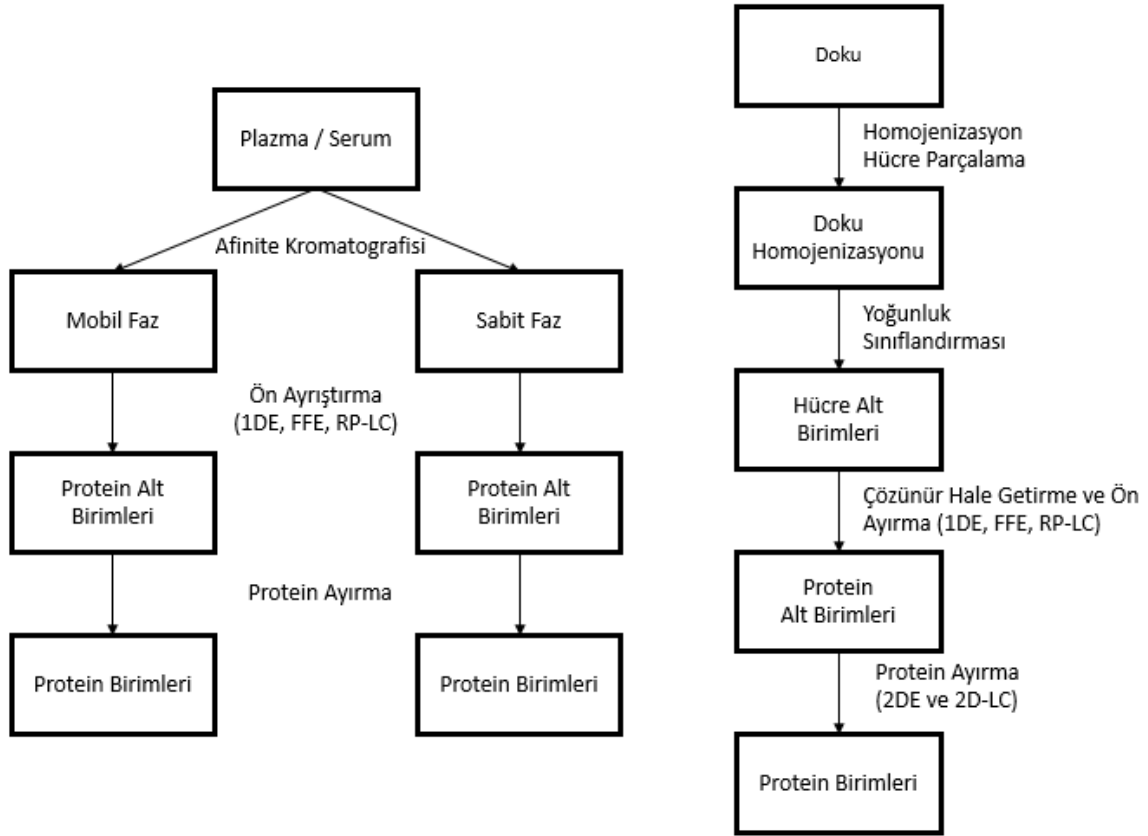
2.1.1. Proteomiksin Çalışma Alanları

Proteomiks çalışma alanları aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Proteomik karakterizasyonu: Araştırma veya profillemeye olarak da bilinmektedir; bir hücre, doku veya biyosıvı içerisinde bulunan tüm proteinlerin tanımlanmasıdır.
2. Ayrımsal proteomiks: Ayrımsal olarak ekspresyona tabi tutulmuş proteinlerin farklı fizyolojik hallerinin (örn.; sağlıklı veya hastalıklı, ilaçlanmış veya zehirlenmiş denekler) çalışma alanıdır.
3. Fonksiyonel proteomiks: Belirli bir hücresel fonksiyonu yerine getirmek için etkileşen bir protein ağının belirlenmesidir.
4. Yapısal proteomiks: Protein ve protein komplekslerinin 3-boyutlu yapıları ve dinamiklerinin çalışma alanıdır.
5. Post-translasyonel modifikasyon proteomiks: post-translasyonel modifikasyona tabi tutulmuş proteinlerin, özellikle fosforilasyon (fosfoproteomiks) ve glikozilasyon (glikoproteomiks) çalışma alanıdır.

2.1.1.1. Protein Karışımları için Ayırma Yöntemleri

Biyolojik örnekler içerisindeki proteinlerin çeşitliliği ve karmaşıklığı nedeniyle, yüksek dereceli ayırma yapılması çok önemlidir [8]. Proteinlerin şekil, yük, hidrofobiklik, afinite gibi ayrımsal özellikleri ile uygun ayırma ve saflaştırma gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2.3). En çok kullanılan yöntemler; tek-boyutlu jel elektroforez (1-DE), iki-boyutlu jel elektroforez (2-DE) ve iki-boyutlu (2-D) sıvı kromatografisidir (LC).



Şekil 2.3. Proteinlerin çeşitli biyolojik kaynaklardan saflaştırılmasının şematik gösterimi.

2.1.1.1.1. İki-Boyutlu (2-D) Jel Elektroforez

2-DE, biyolojik kaynaklı karmaşık protein karışımlarının ayrılmasında son yıllarda kullanılan en güçlü ve sağlıklı yöntemdir [4]. İki-boyutlu yaklaşım; izoelektrik odaklama (IEF) ve sodyumdodesil sülfat (SDS) – poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemlerinin birleşiminden oluşmaktadır.

Bu yöntemde proteinler önce izoelektrik noktalarına göre ayrıştırıldıktan sonra moleküler büyüklüklerine göre ayrıştırılmaktadır. Ayrılma işlemi tamamlandıktan sonra jel çeşitli boyalar vasıtası ile boyanarak ayrılan proteinlerin görülmesi sağlanır. Boyanan jel, floresans görüntüleyicisi ile görüntülenir. Bu yöntem ile binlerce protein tek bir deney ile ayrılabilir. Bu tekniğin en önemli avantajlarından birisi, iki-boyutlu plakaların, ayrılmış olan proteinler için uygun saklama ortamı oluşturmasıdır. Dezavantajı ise, çok zaman alıcı, pahalı, tekrarlanabilirliğinin olmaması ve otomasyona uygun olmamasıdır.

Bir proteom analizinde, proteinlerin ayrılmasından sonraki ikinci aşama, proteinlerin küçük birimlere ayrılmasıdır. Kütle spektrometrik cihazlarda analize uygun hale getirmek için proteinler peptitlere ayrıştırılmaktadır. Çeşitli kimyasallar (özellikle enzimler) kullanılarak proteinler seçimli olarak parçalanabilmektedir. Tablo 2.1'deki listelenen endoproteazlar arasında kütle spektrometri tabanlı proteom analizi için en çok tercih edilen tripsindir. Tripsin, lizin ve arjininin C-sonlu tarafındaki bağı kırmaktadır, böylelikle bazik uç içeren C-sonlu peptitler elde edilmektedir.

Enzimatik parçalama genellikle belirli pH, sıcaklık ve tampon koşullarında gerçekleştirilmektedir. Burada kolay uzaklaştırılabilen amonyum karbonat ve amonyum bikarbonat gibi tamponlar tercih edilmektedir.

Kesme ajanı	Seçimlilik	Enzimatik Parçalanma Koşulları (tampon; pH; sıcaklık (°C))
Kimyasal ajanlar		
Siyanojen bromür	Met-X	%70 TFA
N-klorosüksinimit	Trp-X	%50 asetik asit
N-bromosüksinimit	Trp-X	%50 asetik asit
Yüksek seçimliliğe sahip proteazlar		
Tripsin	Arg-X, Lys-X	50 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃ ; 8.5; 37
Endoproteinaz Glu-C	Glu-X	50 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃ ; 7.6; 37
Endoproteinaz Arg-C	Arg-X	50 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃ ; 8.0; 37
Endoproteinaz Lys-C	Lys-X	50 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃ ; 8.5; 37
Endoproteinaz Asp-N	X-Asp	50 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃ ; 7.6; 37
Seçimli olmayan proteazlar		
Kimotripsin	Phe-X, Tyr-X, Trp-X, Leu-X	50 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃ ; 8.5; 37
Termolizin	X-Phe, X-Leu, X-Ile, X-Met	50 mmol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃ ; 8.5; 37
Pepsin	Phe-X, Tyr-X, Trp-X, Leu-X	0.01 mol L ⁻¹ HCl; 2.0; 37
Elastaz	Geniş seçimlilik	5 mol L ⁻¹ NH ₄ HCO ₃ ; 37

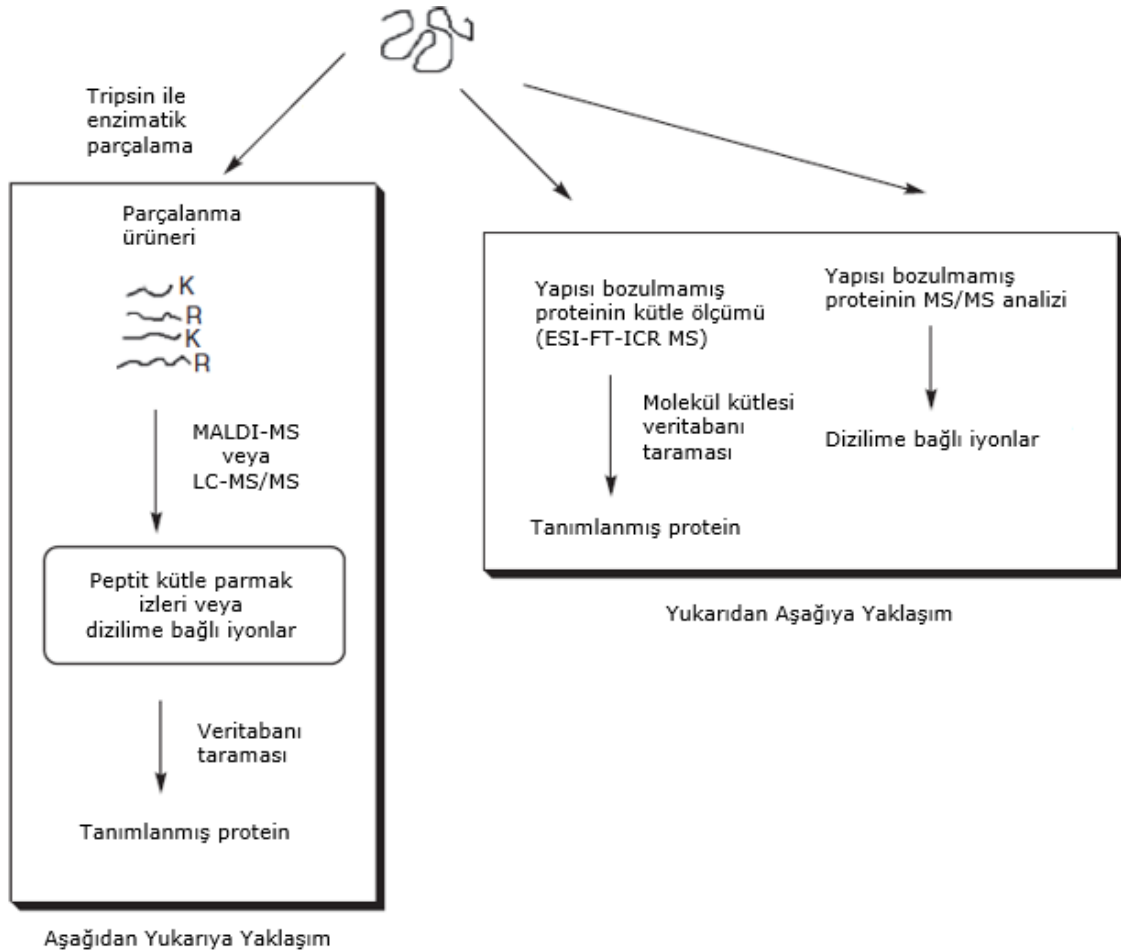
Tablo 2.1. Çeşitli protein parçalama ajanları

2.2. Proteomların Kütle Spektrometrik Analizi

2.2.1. Aşağıdan Yukarıya ve Yukarıdan Aşağıya Yaklaşımlı Proteomiks

Proteom analizi için kütle spektrometrisi iki kategoriye ayrılabilir (Şekil 2.4): (1) "Aşağıdan-yukarıya yaklaşım" proteomiks ve (2) "Yukarıdan-aşağıya yaklaşım" proteomiks [10]. İlk gruptaki proteomiks yaklaşımı, kütle spektrometrisinin peptit

düzeyinde uygulanarak molekül kütlelerinin veya aminoasit diziliminin eldesi için kullanılmaktadır. İkinci gruba ait yaklaşımda ise, proteinler daha küçük birimlere ayrılmaz, bunun yerine Fourier-Dönüşümlü (FT) – İyon Siklotron Rezonans (ICR) - tabanlı yüksek-çözünürlüklü tandem kütle spektrometreleri ile yapısı bozulmadan proteinlerin analizleri yapılır. Burada proteinden elde edilen veriler bir veritabanı kullanılarak karakterize edilmektedir. Yukarıdan-aşağıya yaklaşım, modifiye edilmiş proteinlerin belirlenmesi için daha uygun bir yöntemdir. Bu yaklaşımda bozulmamış proteinlerin molekül kütlesi ilk önemli parametredir. Molekül kütlesi vasıtasıyla, yorumlanan dizilimlerin doğruluğu, nokta mutasyonlarının saptanması, post-translasyonel modifikasyonların derecesi, sistein kalıntıları ve disülfid bağlarının sayısının hesaplanması mümkün olmaktadır. ESI-MS ve MALDI-MS, proteinlerin molekül kütlelerinin bulunmasında tercih edilen yöntemlerdir. Yüksek kütleli biyopolimerlerin ESI-MS ile çoklu iyonları oluşturularak, hedeflenen proteinin kesin olarak molekül kütlesi bulunabilmektedir. MALDI daha basit bir spektrum vererek genellikle tek protonlanmış iyonları içermektedir.



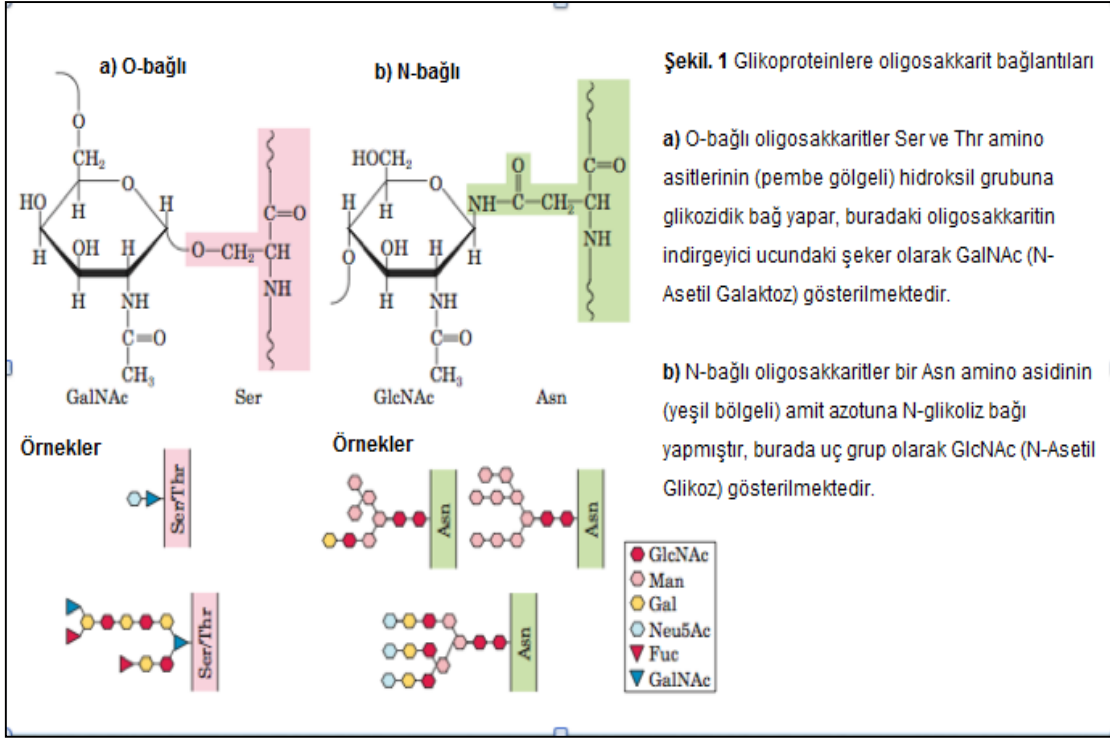
Şekil 2.4. Aşağıdan-Yukarıya ve Yukarıdan-Aşağıya yaklaşım türleri.

2.3. Protein ve Peptitlerin Post-Translasyonel Modifikasyonları (PTM)

Amin, tiyol, tiyoeter, karboksilik asit veya hidroksil gibi belirli aktif grup içeren aminoasitler, gelişmeye başlayan proteinin hücre içerisindeki transferi sırasında çeşitli kovalent modifikasyonlara uğramaktadırlar. 300'den fazla post-translasyonel modifikasyon bilinmekte olup, en sıkça rastlananları ise açilleme (asetil, formil ve miristil), karboksilasyon, glikozilasyon, lipidasyon, amidasyon, oksidasyon, nitrasyon, nitrozilasyon, fosforilasyon, sülfasyon, asetilasyon, hidroksilasyon ve proteolizdir. Bu modifikasyonlar ile çeşitli hücresel fonksiyonlar harekete geçirilmektedir. Kütle spektrometrik teknikler ile bu tür modifikasyonlara uğramış proteinler ve peptitler incelenebilmektedir. Bu teknikler, modifikasyon sonucundaki kütle değişimine dayanmaktadır. Post-translasyonel modifikasyonlar arasında en çok öneme sahip olan iki modifikasyon; fosforilasyon ve glikozilasyondur.

2.3.1. Glikoproteomiks

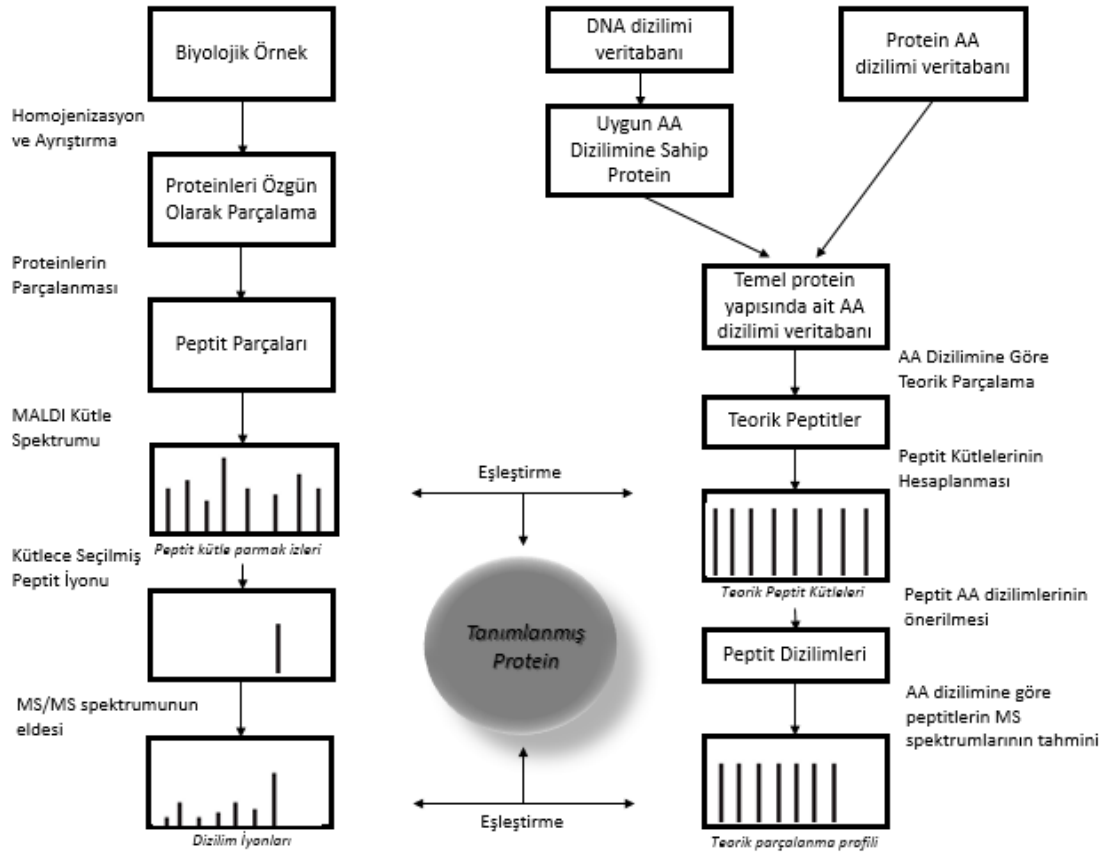
Ökaryot sistemlerdeki memeli proteinlerinin %50'sinden fazlası glikozilasyona uğramış formda bulunmaktadır. Glikozilasyon terimi, karbonhidrat zincirlerinin polipeptitlere asparjin yan zinciri üzerindeki primer amitin azot atomu üzerinden (N-glikozilasyon) veya serin ve treonin yan zincirlerindeki oksijen atomları üzerinden (O-glikozilasyon) bağlanması anlamına gelmektedir. Karbonhidrat bağlanması sonucunda oluşan formlara glikan adı verilmektedir.



Şekil 2.5. Glikoproteinlere oligosakkarit bağlantılarının şematik gösterimi.

Memeli proteinlerinde en çok bulunan karbonhidrat yan zincirlerindeki monosakkaritler; D-Mannoz (Man veya Hex), D-Galaktoz (Gal veya Hex), L-Fruktoz (Fuc veya dHex), N-Asetilglukozamin (GlcNAc veya HexNAc), N-Asetilgalaktozamin (GalNAc veya HexNAc) ve N-asetilneuraminik asittir (Siyalik asit, Neu5Ac veya NANA). Proteinlerin glikozilasyonu hücre biyolojisinde çok önemli rollere sahiptir. Hücre içi taşıma, hücre tanıma, hücreler arası etkileşimler gibi fonksiyonların yanı sıra, proteinlerin fizikokimyasal (örn., çözünürlük ve kararlılık) ve biyolojik (örn., immünojenik ve proteolitik kararlılık) gibi özelliklerinin ayarlanmasında etkilidir.

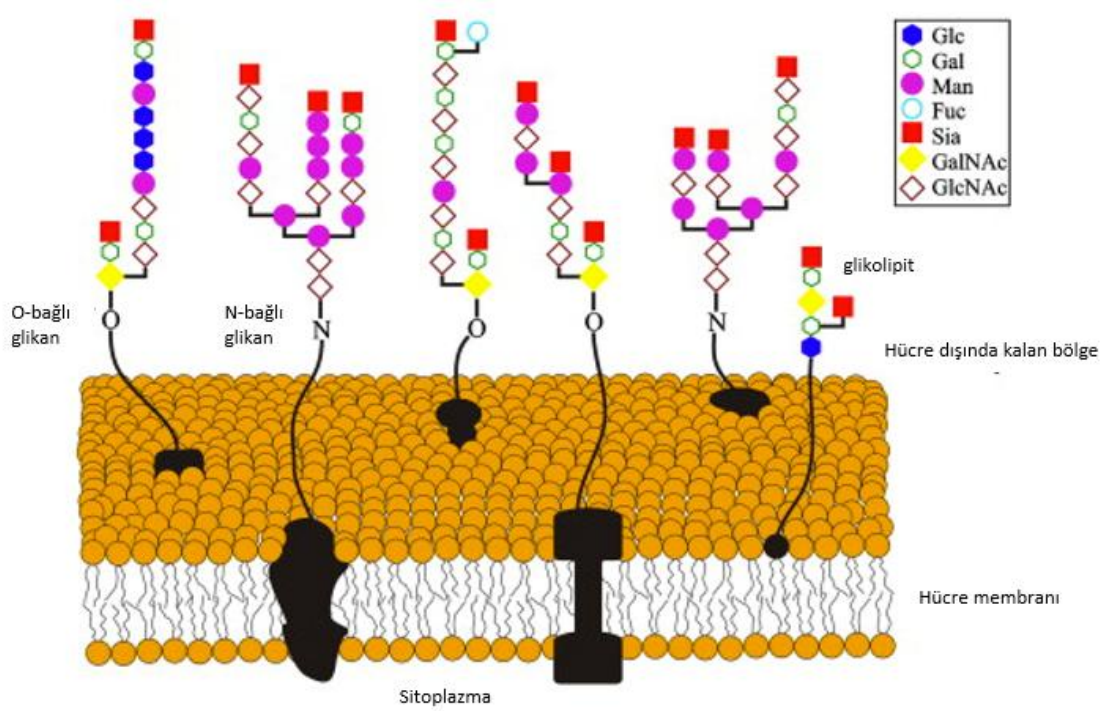
Şekil 2.6'da glikoproteinlerin karakterizasyon basamakları gösterilmektedir. İlk basamakta glikoproteinlerin molekül kütlesi ölçülmektedir. Glikozilasyona uğramamış proteinin (örn., proteinin cDNA dizilim bilgileri kullanılarak) kütlesi ile hedef glikoprotein kütlesi karşılaştırılarak, glikan kütlesi hesaplanabilir. MALDI-MS ve ESI-MS glikoproteinlerin kütle analizleri için en uygun yöntemlerdir [11].



Şekil 2.6. Glikoproteinlerin karakterizasyon basamaklarının şematik gösterimi.

2.3.1.1. Glikopeptitlerin Karakterizasyonu

Kütle spektrometrik analizler genellikle peptit düzeyinde yapıldığından, glikoproteinlerin Tablo 2.1’de verilen tripsin veya diğer benzer enzimlerle enzimatik parçalanması ile daha küçük peptit parçalarına ayrılması gereklidir. Bir proteinin glikozilasyona uğrayıp uğramadığını anlayabilmek için, glikozilasyona uğramış ve uğramamış formlar karşılaştırılır [12-14]. Karbonhidrat zincirlerinin glikoproteinin yapısından ayrılmasından (PNGase ile muamele) önce ve sonrasındaki proteolizi ile iki tane peptit haritası ortaya çıkmış olur. PNGase ile muamele edilmiş kesitin peptit haritasındaki yeni pikler, glikopeptitlerin varlığını doğrulamaktadır. Eğer proteinin sekansı da biliniyorsa, yeni peptitin m/z değeri, onun glikoprotein içerisindeki yerinin de bulunmasında öncülük etmektedir.



Şekil 2.7. Hücre membranında bulunan oligosakkarit yapıları.

2.3.1.2. Siyalik Asit (*N*-asetilneuraminik asit)

Siyalik asitler dokuz karbonlu 2-keto-3-deoxy şeker ailesi olup 40'tan fazla çeşidi olmakla birlikte, her birinin varlığı glikoproteinlerin özelliklerini değiştirmektedir [15]. Glikoproteinlerin uç noktasından bağlanan ve pKa değeri yaklaşık olarak 2.6 olan [16], bu sebepten ötürü fizyolojik ortamda negatif yüklü olan yapılardır. En çok bulunan siyalik asit türü *N*-asetilneuraminik asit (Neu5Ac) olup, bu yapı 5-karbon bölgesinde *N*-asetil grubu içermektedir.

Vücuttaki siyalik asit miktarının artması, tümör oluşumu, ateşli hastalıklar, diyabet, miyokardiyal enfarktüs ve alkolizm gibi pek çok hastalığın belirtisidir [17-23].

Siyalik asidin biyolojik fonksiyonları [24]:

1. Glikoproteinlerin ve hücre membranlarına ait konformasyonların kararlılığını sağlamak
2. Hücreler arası tanıma ve etkileşimine yardım etmek
3. Membran taşımasına katkıda bulunmak
4. Membran reseptörlerinin fonksiyonlarını değiştirerek ligandlar için bağlanma bölgeleri oluşturmaktır.

2.3.1.3. Glikopeptitlerin Zenginleştirilmesi

Kütle spektrometrisi tabanlı proteomiks çalışmalarında genellikle triptik peptitlerin ve glikopeptitlerin, saflaştırılmış (gliko)peptitlerden veya SDS-PAGE jel içerisinde bulunan protein setlerinden veya bir organizmanın bütün proteomundan analizleri yapılır. Bu karışımlar içerisinde glikopeptitlerin analizi genellikle zor olmakta, bunun sebebi ise glikopeptitlerin çeşitli türlerde glikoformlar oluşturması için glikozilasyon bölgelerinde kalabalık gruplar halinde glikanlar bulundurmaları, böylelikle toplam peptit havuzu içerisinde bu yapıların derişimlerinin nispeten düşük olması olarak açıklanabilir. Bu sebepten ötürü, genel veya özgün glikoproteomların hedeflenmesi için plazma, idrar veya hücre gibi karmaşık örneklerden analizleri için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Glikopeptit veya glikoproteinlerin kütle spektrometrisi tabanlı araştırmalarında çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Kullanılan yöntemlerde, zenginleştirilmiş triptik glikopeptitlere ait N-glikozilasyon bölgeleri genellikle PNGase ile asparjin, aspartik asite dönüştürülerek LC-MS/MS veya MALDI-MS/MS ile tayin edilir [25-32].

Glikoproteinlerin veya glikopeptitlerin afinite kromatografisi ile izolasyonunda çeşitli lektinler kullanılmıştır [33, 34]. Konkanavalin A (Con A) kullanılarak yapılan lektin kromatografisi, insan idrarı, serumu veya *Caenorhabditis elegans* plazma membranı gibi çeşitli biyolojik kaynaklarına ait N-glikoproteinlerin zenginleştirilmesinde kullanılmıştır. [25, 26, 35, 36]. Bu lektinin özelliği, O-glikozilasyon bölgelerine sahip yapıların kendisine bağlama özelliğine sahip olmamasıdır [26, 37, 38]. Bunların yanı sıra, çok boyutlu lektin kromatografisi, alt-glikoproteom birimlerinin karşılaştırmalı analizi için çok etkili bir yöntemdir [39].

Seçimli lektin-afinite glikopeptit zenginleştirme yöntemlerine ek olarak, glikopeptit ve glikoproteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak yapılan yaklaşımlar da mümkün olmaktadır. Örneğin, karmaşık bir peptit/glikopeptit karışımı içerisinde triptik glikopeptitlerin diğerlerine kıyasla daha büyük bir kütleye sahip olmaları çok büyük bir avantajdır. Glikopeptitler büyüklükçe eleme kromatografisi ile zenginleştirilebilmektedir [40]. Glikanların hidrofilik özelliklerinden yararlanılarak, selüloz veya sefroz gibi karbonhidrat jel matrisler ile olan hidrofilik etkileşimler ile zenginleştirme yapılabilmektedir [41]. Hidrofilik etkileşimlerin kullanıldığı

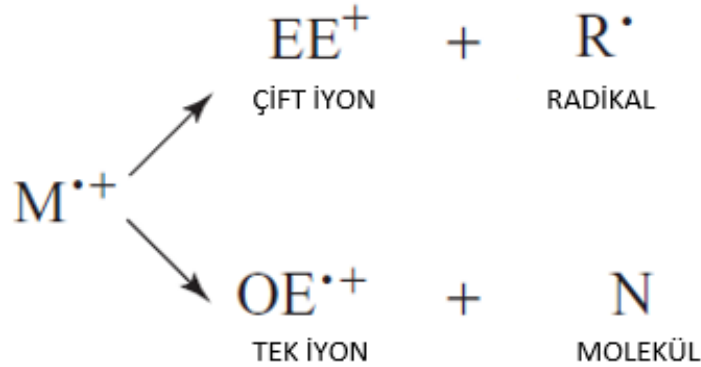
ekstraksiyon yöntemi ile insan serumu ve plazmasından alınan glikoproteinler ile [42, 43] ve tüm serum glikoproteinler ile [44] zenginleştirme çalışmaları yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada jel ile ayrılan glikoproteinlerin saflaştırılması için grafit mikrokolonlar kullanılmıştır [44].

2.4. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisi, bir bileşiğin molekül ağırlığının bulunması ve muhtemel bileşenlerinin analizi için kullanılmaktadır. Bileşiklerin kütle spektrometrik analizi, bileşiğin gaz fazındaki iyonlarının oluşturulması ile gerçekleştirilmektedir.



Elektron iyonlaştırma ile oluşan M^+ moleküler iyonu normalde parçalara ayrılır. Bu iyon bir radikal katyon olup tek sayıda elektron içerdiğinden, ya radikal ve çift sayıda elektron içeren bir iyon, ya da bir moleküle ve yeni bir radikal katyonuna ayrılacaktır:



Şekil 2.8: Moleküler iyon oluşumunun şematik gösterimi.

Bu iki tür iyonun kimyasal özellikleri farklıdır. Moleküler iyondan elde edilen ana ayrılma ürün iyonu, tekrar tekrar parçalara ayrılır. Tüm bu ayrılan iyonlar kütle spektrometresinde, kütle/yük oranına göre ayrılır ve bolluğuna göre oranlanarak tayin edilir. Böylelikle bir moleküle ait kütle spektrumu oluşturulur.

Kütle spektrumu bar grafiği veya verilerden oluşan tablo olarak gösterilebilir. En şiddetli pik, ana pik olarak adlandırılır ve bağıl olarak diğer piklerin yanında %100 olarak kabul edilir. Diğer piklerin şiddet ve bollukları, ana pike göre hesaplanarak yüzde cinsinden ifade edilir.

Pek çok pozitif iyon, tek bir elektronun kaybedilmesi ile oluşmaktadır. Ancak büyük moleküller için, çoklu iyonlar da elde edilebilmektedir. İyonlar, kütle/yük oranına göre ayrılmakta ve tayin edilmektedir. İyonların toplam yükü q , elektron yükü e ve iyonların yük sayısı z olmak üzere:

$$q = ze \text{ ve } e = 1.6 \times 10^{-19} \text{ C'dur.} \quad (\text{Eşitlik 2.2})$$

Kütle spektrumunun y-ekseni iyon sayısı veya bağıl iyon şiddetini gösterirken, x-ekseni kütle/yük oranını (m/z) göstermektedir. Burada m bağıl kütle ve z yük sayısı ve bu iki kavram birimsiz olduğundan, m/z ifadesi boyutsuz bir büyüklüğü ifade etmektedir.

Genellikle kütle spektrometrisinde yük, bir elektronun yükünün mutlak değeri ($1 e = 1.602177 \times 10^{-19} \text{ C}$) cinsinden ve kütle ise atomik kütle birimi ($1 u = 1.660540 \times 10^{-27} \text{ kg}$) cinsinden ifade edilir. Önceden belirtildiği üzere, kütle spektrometrisinde ölçülen fiziksel özellik kütle/yük oranıdır. Kütle, atomik kütle birimi (u) cinsinden ve yük elementel yük birimi (e) cinsinden ifade edildiğine göre, kütle/yük oranının boyutları U/e olmaktadır. Basite indirildiğinde, Thomson (Th), yeni bir birim olarak önerilmiştir [45]. Buna göre:

$$1 \text{ Th} = 1 u/e = 1.036426 \times 10^{-8} \text{ kg C}^{-1} \text{ 'dir.} \quad (\text{Eşitlik 2.3})$$

Buna rağmen, genelde stokiyometrik hesaplamalarda kullanılan ortalama izotopik kütle ile ilgilenildiğinde, Dalton (Da) birimi ile ve kütle spektrometrisinde her bir elementin ana izotopuna ait kütle, u ile ifade edilir.

Bir atom, molekül ya da iyonun tanımlanmasında ve kütlelerinin hesaplanmasında pek çok yöntem kullanılmaktadır. Stokiyometrik hesaplamalar için, atom ağırlığı yani molekül içerisindeki atomların farklı izotoplarına ait kütlelerin ortalaması kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisinde ise, nominal kütle ya da monoizotop kütlesi genellikle kullanılmaktadır. Nominal kütle, aynı zamanda nükleon sayısı olarak da bilinmekte olup, her bir elemente ait ana izotopun kütlelerinin en yakın tamsayıya yuvarlanması ile hesaplanmaktadır. Ancak, izotopların kesin kütleleri,

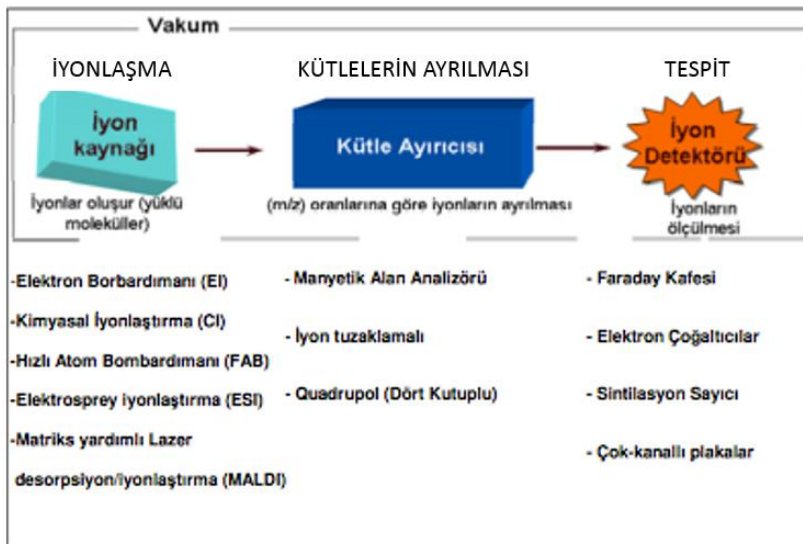
kesin olan tam sayılar değildir. Proton, nötron ve elektron sayılarının farklılıklarından ötürü, toplamda küçük farklar bulunmaktadır. Bu farklar, kütle kusurları olarak adlandırılmaktadır ve bu parçacıkları bir arada tutan bağlanma enerjisine eşittir. Bu nedenle her izotopun kendine özgü ve karakteristik bir kütle kusuru vardır. Monoizotopik kütle bu tür kütle kusurlarını da göz önüne alarak, her bir elemente ait en çok bulunan izotopunun kesin kütlesi kullanılarak hesaplanmaktadır.

Ortalama kütle, nominal kütle ve monoizotopik kütle arasındaki farklar, atom sayısına ve bu atomların izotopik dağılımlarına bağlı olarak birkaç Da kadar farklı olabilmektedir.

2.4.1. Çalışma Prensipleri

Bir kütle spektrometresinde her zaman şu bileşenler bulunur;

1. Örnek girişi; kütle spektrometresinin içine yerleştirilebilen prob
2. İyonlaşma kaynağı; örnekten analitlerin iyonlaşmasını sağlar
3. Kütle Analizörleri; iyonların kütle/yük oranına göre ayrılmasını sağlar
4. Dedektör; iyonların sayılmasını sağlar
5. Veri işleme sistemi; kütle spektrumunun uygun şekilde oluşturulmasını sağlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Kütle Spektrometresinin Bileşenleri.

Bir kütle spektrometresi aşağıdaki süreçleri yerine getirmelidir:

1. İyon oluşturma,
2. Kütle/yük oranına göre kütle ayırıcısı içerisinde oluşturulan iyonları ayırma,
3. Seçilen iyonları parçalama ve ikinci bir kütle analizöründe parçalanma ürünlerinin analizi (MS/MS),
4. Son analizörden çıkan iyonların tayini ve bolluğunun ölçümü, dedektör ile iyonların elektrik sinyallerine dönüşümü,
5. Dedektörden elde edilen sinyallerin bilgisayara aktarımı.

2.4.2. Tarihçe

1897'deki Thomson'ın deneylerinden bu yana, çok fazla sayıda kütle spektrometresi geliştirilmiştir. Aşağıdaki listede bu gelişim tarih sırasına göre verilmiştir:

1886: E.Goldstein gaz boşalım içerisinde anot ışınlarını (pozitif gaz fazı iyonlarını) bulmuştur.

1897: J.J. Thomson, elektronu ve elektronun kütle/yük oranını keşfetmiştir. (1906 Nobel Ödülü)

1898: W. Wien, manyetik saptırma ile anot ışınlarını analiz etmiş ve bu ışınların pozitif yük taşıdığını kanıtlamıştır [46] (1911 Nobel Ödülü).

1901: W. Kaufmann, katot ışınlarını paralel elektrik ve manyetik alanlar kullanarak analiz etmiştir [47].

1909: R. A. Millikan ve H. Fletcher, yükün basit birimini bulmuşlardır.

1912: J. J. Thomson, ilk kütle spektrometresini (daha sonra bu sisteme parabol spektrografi adı verilmiştir) yapmıştır [48]. O₂, N₂, CO, CO₂ ve COCl₂'nin kütle spektrumunu almıştır. Negatif ve çoklu yüklere sahip iyonlar gözlemlemiştir. Yarı kararlı (metastable) iyonları keşfetmiştir. 1913 yılında ise, Neon'a ait 20 ve 22 izotoplarını keşfetmiştir.

1918: A. J. Dempster, elektron iyonlaştırma kaynağını ve ilk spektrometreyi geliştirmiştir [49].

1919: F. W. Aston, hız odaklı ilk kütle spektrometresini geliştirmiştir [50]. (1922 Nobel Ödülü). 1923'te kütle kusurlarını ölçmüştür [51].

1932: K. T. Bainbridge, Einstein tarafından öne sürülmüş olan kütle-enerji denkleğini ispatlamıştır [49].

1934: R. Conrad, organik kimyada kütle spektrometrisini uygulamıştır [50].

1934: W. R. Smythe, L. H. Rumbaugh ve S. S. West ilk defa izotop ayrılmasında başarılı olmuşlardır [52].

1940: A. O. Nier, uranyum-235'i izole etmiştir [53].

1945: J. A. Hipple ve E. U. Condon tarafından ilk yarı kararlı pikler keşfedilmiştir [54].

1948: A. E. Cameron ve D. F. Eggers doğrusal uçuş zamanlı (LTOF) kütle spektrometresi için dizayn ve kütle spektrumlarını yayınlamışlardır [55]. Bu fikir ilk olarak W. Stephens tarafından 1946 yılında önerilmiştir [56].

1949: H. Sommer, H. A. Thomas ve J. A. Hipple iyon siklotron rezonans (ICR) için ilk kütle spektrometrik uygulamayı tanımlamışlardır [57].

1952: Quasi-denge (QET) [58] ve RRKM [59] teorileri, iyonların monomoleküler ayrışmalarını açıklamıştır. R. A. Marcus bu konuyla ilgili 1992 yılında Nobel Ödülü'nü almıştır.

1952: E. G. Johnson ve A. O. Nier, çift-odaklı cihazları geliştirmişlerdir [60].

1953: W. Paul ve H. S. Steinwedel kuadrupol analizörü ve iyon tuzağını bir patentte tarif etmiştir [61]. W. Paul, H. P. Reinhard ve U. Von Zahn, kuadrupol spektrometresini tarif etmişlerdir. Paul ve Dehmelt 1989'da bu konuyla Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür [62].

1955: W. L. Wiley ve I. H. McLaren, LTOF tasarımında büyük yenilikler yapmışlardır [63].

1956: J. Beynon, yüksek çözünürlüğün ve iyonlara ait elementel bileşenlerin kesin kütle tayinlerinin yapılmasının analitik olarak faydasını göstermiştir [64]

1956: İlk defa bir kütle spektrometresi, gaz kromatografisi cihazı ile F. W. McLafferty [65] ve R. S. Gohlke tarafından eşleştirilmiştir [66].

1957: Kratos firması çift-odaklı ilk ticari kütle spektrometresini piyasaya sürmüştür.

1958: Bendix firması ilk ticari LTOF cihazını piyasaya sürmüştür.

1966: M. S. B. Munson ve F. H. Field kimyasal iyonlaşmayı (CI) keşfetmişlerdir [67].

1967: F. W. McLafferty [68] ve K. R. Jennings [69] çarpışma ile indüklenmiş bozunma (CID) işlemini geliştirmişlerdir.

1968: Finnigan firması ilk ticari kuadropol kütle spektrometresini piyasaya sürmüştür.

1968: İlk veri işleme birimlerine sahip kütle spektrometreleri piyasaya çıkmıştır.

1969: H. D. Beckley organik moleküllerin alan desorpsiyonlu (FD) kütle spektrometrisini açıklamışlardır [70].

1972: V. I. Karatev, B. A. Mamyrim ve D. V. Smikk, bir TOF kütle spektrometresindeki iyonların kinetik enerji dağılımlarının düzeltmelerini yapan reflektoru bulmuştur [71].

1973: R. G. Cooks, J. H. Beynon, R. M. Caprioli ve G. R. Lester, 'Yarı Kararlı İyonlar' başlıklı kitabı yayınlamışlardır [72].

1974: E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, K. D. Haegele, M. D. Horning ve R. N. Stillwell, atmosferik basınçta kimyasal iyonlaşmayı (APCI) keşfetmişlerdir [73].

1974: P. J. Arpino, M. A. Baldwin ve F. W. McLafferty tarafından ilk defa spektrometreler, yüksek-performanslı sıvı kromatograflar ile eşleştirilmişlerdir [74].

1974: M. D. Comisarov ve A. G. Marshall, Fourier dönüşümlü ICR kütle spektrometrisini geliştirmişlerdir [75].

1975: İlk defa kapiler kolona sahip gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC-MS) cihazları piyasaya sürülmüştür.

1976: R. D. Macfarlane ve D. F. Torgesson plazma desorpsiyon kaynağını bulmuşlardır [76].

1978: R. A. Yost ve C. G. Enke ilk üçlü kuadropol kütle spektrometresini yapmışlardır [77].

1980: R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, A. L. Gray ve E. Taylor, indüktif eşleşmiş plazma (ICP) kütle spektrometrisinin potansiyelini göstermişlerdir [78].

1981: M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick ve A. H. Tyler, hızlı atom bombardımanı (FAB) kaynağını tanımlamışlardır [79].

1982: FAB [80] ve PD [81] ile ilk olarak insülinin (5750 Da) tam spektrumu verilmiştir.

1982: Finnigan ve Sciex firmaları ilk ticari üçlü kuadropol kütle spektrometrelerini piyasaya tanıtmışlardır.

1983: C. R. Blakney ve M. L. Vestal termosprey (TSP) kavramını ilk defa açıklamışlardır [82].

1983: G. C. Stafford, P. E. Kelly, J. E. Syka, W. E. Reynolds ve J. F. J. Todd, Ion Trap adı ile ticarileştirilen, iyon tuzağı dedektörlü olan bir gaz kromatografi cihazını geliştirmişlerdir [83].

1987: T. Tanaka [84] ve M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr ve F. Hillenkamp [51], Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırıcıyı (MALDI) bulmuşlardır. Tanaka 2002 yılında Nobel Ödülü almıştır.

1987: R. D. Smith kapiler elektroforezin (CE) kütle spektrometrisi ile eşleştirilmesini açıklamıştır [85].

1988: J. Fenn elektrospreyi (ESI) geliştirmiştir [86]. İlk olarak 20000 Da üzerindeki proteinlerin spektrumları görülmüştür. Kendisi ayrıca 1984 yılında [87] elektrospreyin küçük moleküller için olan kütle spektrometrik teknik potansiyelini göstermiştir. Bu kaynak ilk olarak 1968 yılında M. Dole tarafından önerilmiştir [88]. Fenn, 2002 yılında Nobel Ödülü almıştır.

1991: V. Katta ve B. T. Chait [89] ve B. Gamen, Y. T. Li ve J. D. Henion [90], bazı kovalent-olmayan komplekslerin kütle spektrometrisi ile tayin edilebileceğini göstermişlerdir.

1991: B. Spengler, D. Kirsch ve R. Kaufmann, refletron TOF kütle spektrometrisi ile yapısal bilgiler elde etmişlerdir [91].

1993: R. K. Julian ve R. G. Cooks, Dalga Hali - Muhafazalı Ters Fourier Dönüşümü (Stored-Waveform Inverse Fourier Transform, SWIFT) kullanarak iyonların geniş bantta uyarılmasını geliştirmişlerdir [92].

1994: M. Wilm ve M. Mann nanoelektrosprey kaynağı geliştirmişlerdir [93].

1999: A. A. Makarov yeni bir tür kütle analizörü olan 'orbitrap' i geliştirmiştir. Orbitrap, elektrostatik kuadro-logaritmik alan kullanılan yüksek-performanslı bir iyon tuzağıdır [94].

2.4.3. İyon Kaynakları

İyon kaynaklarında, kütle spektrometresinde analizi gerçekleştirilecek olan örnekler iyonlaştırılır. Kütle spektrometrisinde pek çok çeşitli iyonlaşma tekniği söz konusudur. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar iyonlaşma işlemi sırasında aktarılan iç enerji ve iyonlaşacak analitin fizikokimyasal özellikleridir. Bazı iyonlaşma teknikleri çok yüksek miktarda enerjili olup, geniş bir ayrılmaya yol açmakta iken, diğer iyonlaşma teknikleri daha yumuşak olup sadece moleküler türlerin iyonlarını oluşturmaktadır. Elektron iyonlaştırma, kimyasal iyonlaştırma ve alan iyonlaştırma sadece gaz fazında mümkün olup, bu tür kaynakların uygulamaları ancak uçucu ve ısıl olarak kararlı olan bileşikler ile sınırlıdır. Ancak çok büyük sayıdaki bileşikler ısıl olarak kararsız veya yeterli buhar basıncına sahip olmamaktadır. Bu tür bileşiklere ait moleküller doğrudan gaz fazına transfer edilmelidir.

Direkt iyon kaynakları iki tür olarak bulunmaktadır: sıvı-hal iyon kaynakları ve katı-hal iyon kaynakları. Sıvı-hal iyon kaynaklarında analit bir çözelti içerisinde bulunmaktadır. Bu çözeltinin nebülizasyonu ile oluşan damlacıklar, atmosferik basınçta iyonların oluşturulduğu kaynağa verilir ve kütle spektrometresine bu iyonlar vakum pompaları vasıtasıyla odaklandırılır. Elektrosprey, atmosferik basınç kimyasal iyonlaşma ve atmosferik basınçta fotoiyonlaşma bu bahsedilen türler ile ilişkilidir. Katı-hal kaynaklarında ise, analit uçucu olmayan bir kaynaktır. Bu kaynak, katı veya viskoz bir akışkanın oluşturduğu bir matriks olabilir. Kaynak, enerji yüklenmiş partiküller veya fotonlar ile ışınlandığında, kaynağın yüzeyine yakın kısımdan iyonlar desorbe etmektedir. Bu iyonlar bir elektriksel alan ile ekstrakte edilerek analizöre doğru odaklandırılır. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşma, ikincil iyon kütle spektrometrisi, plazma desorpsiyonu ve alan desorpsiyonu kaynaklarının tamamı bahsedilen yöntem ile iyon oluşturmaktadır. Hızlı atom bombardımanı, uçucu olmayan sıvı matriks kullanmaktadır [95].

2.4.3.1. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşma

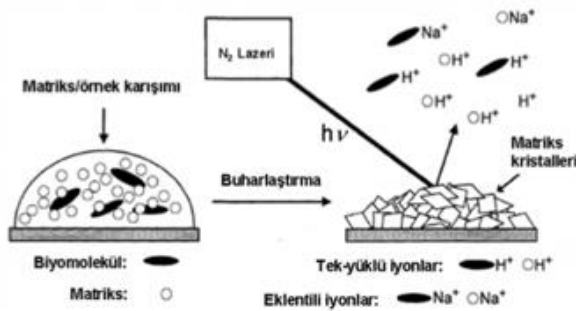
Yöntem 1988 yılında Karas ve Hillenkamp tarafından önerilmiştir [49-51]. O zamandan bu yana, uçucu olmayan ve ısıl olarak kararlılığa sahip olmayan

proteinler, oligonükleotitler, sentetik polimerler ve büyük anorganik bileşiklerin gaz-fazı iyonlarının oluşturulması için kullanılan en yaygın ve güçlü yöntemdir. Bir MALDI matriksinin kullanılması, hem desorpsiyon hem de iyonlaşmayı mümkün kıldığından, bu iyonlaşma yönteminin başarılı olmasındaki en önemli faktördür. Bu metotta örnek hazırlama yöntemi kolay olup; tuz, tampon, deterjan vb. kirliliklere karşı çok yüksek toleransa sahiptir [52, 53].

2.4.3.1.1. MALDI Çalışma Prensibi

MALDI iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta, analiz edilmek istenen bileşik matriks adı verilen organik moleküller ile çeşitli oranlarda karıştırılır. Bu moleküllerin lazer dalgaboyunda kuvvetli absorpsiyon özelliğinin olması gereklidir. Analiz öncesinde bu karışım kurutulur ve böylelikle çözelti hazırlanması sırasında kullanılan sıvı çözücü uzaklaştırılmış olur. Sonuç olarak oluşan katı çözeltisi, analit yüklenmiş matriks kristallerinden oluşmaktadır.

İkinci basamak, kütle spektrometresi içerisinde ve vakum ortamında gerçekleşmektedir. Bu basamakta, katı çözelti üzerine kısa süreli aralıklarla lazer pulsları uygulanmaktadır. MALDI mekanizması bütünüyle kesin olarak açıklanamamıştır [54, 55]. Ancak, lazer ışınması ile kristallerin hızla ısınması sonucu matriksin ve dolayısıyla içerisinde bulunan analitin süblimleşerek gaz fazına geçtiği söylenebilir [56].



Şekil 2.10. MALDI İyonlaşma Mekanizmasının Gösterimi.

MALDI yönteminde iyonlaşma; gaz fazı fotoiyonlaşma, uyarılmış hal proton transferi, iyon-molekül tepkimeleri, hali hazırda oluşmuş olan iyonların desorpsiyonu

gibi pek çok şekilde gerçekleşebilir. Gaz fazında bulunan iyonlar daha sonra elektriksel alan yardımı ile analizöre doğru yönlendirilerek hızlandırılırlar.

MALDI diğer iyonlaşma tekniklerine göre daha hassastır. Matriks moleküllerinin sayısı, analit iyonlarına göre çok daha fazla olduğundan, analit iyonları birbirinden uzak kalmakta ve moleküler iyonların analizini engelleyecek herhangi bir muhtemel öbikleşme engellenmiş olmaktadır. Ayrıca matriks, gelen lazer ışınlarının büyük bir kısmını absorplayarak örneğin hasar görmesini engellemekte ve lazerden analite olan enerji transferrinin verimliliğini arttırmaktadır. Böylece yöntemin hassasiyeti mevcut yöntemlere göre daha fazla olmaktadır.

2.4.3.1.2. Matriks Seçimi

MALDI için örnek hazırlama, matriks seçimi ve optimizasyon, analiz için en önemli basamaklardır. MALDI matriksi için seçim öncelikli olarak kullanılan lazerin dalgaboyuna bağlıdır. Buna ek olarak, seçilecek matriks ile analitin yapı olarak birbirlerine uyumluluğu önemlidir. Buna rağmen benzer yapılara sahip analitler için farklı matrikslerin uygun olması mümkün olabilmektedir (Tablo 2.2).

Analit	Matriks	Kısaltma
Peptitler / Proteinler	α -siyano-4-hidroksisinamik asit 2,5-dihidroksibenzoik asit 3,5-dimetoksi-4-hidroksisinamik asit	CHCA DHB SA
Oligonükleotitler	Trihidroksiasetofenon 3-hidroksipikolinik asit	THAP HPA
Karbohidratlar	2,5-dihidroksibenzoik asit α -siyano-4-hidroksisinamik 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-(4-ter-bütilfenil)-2-metil-2-propeniliden) malononitril	DCTB
Lipidler	Ditranol	DIT

Tablo 2.2. Bazı yaygın kullanılan MALDI matriksleri

Bir MALDI matriksinin özellikleri:

1. Lazer dalgaboyunda kuvvetli absorban,
2. Vakuma karşı dayanıklılık,
3. Analitin iyonlaşmasını sağlama,
4. Analite uygun çözücülerde çözünebilme,
5. Analit molekülleri ile kimyasal olarak reaktivitenin az olması

şeklinde olmalıdır.

2.4.3.1.3. Örnek Hazırlama

Literatürde pek çok örnek hazırlama yöntemi bulunmaktadır [96, 97]. Bunların arasında en çok kullanılan ve orijinal olan yöntem, damlacık kurutma yöntemidir. Bu yöntemde doygun matriks çözeltisi (5-10 µL) içerisine çok az miktarda analit çözeltisi (1-2 µL) eklenir. Elde edilen karışımdan bir damlacık (0.5-2 µL) MALDI plakasının üzerine yerleştirilir ve oda sıcaklığında kuruması sağlanır. Çözücü tamamen buharlaşıp, kristal oluştuğunda, örnek kütle spektrometresine yerleştirilerek analize başlanabilir.

2.4.3.2. Elektrosprey (ESI)

ESI yönteminin, Fenn ve arkadaşları tarafından [86, 98] proteinlerden çoklu yüklü iyonlar oluşturulabileceği ve kütle sınırı 2000 Th kadar küçük olan cihazlarla analiz edilebileceği gösterildiği zaman başarısı anlaşılmıştır. İlk kullanılmaya başlandığında sadece protein analizi yapılabildiği düşünülürken, daha sonra polimerler ve biyopolimerler ile [99-101] sınırlı kalmayıp, küçük polar moleküllerin de analizinin yapılabileceği görülmüştür.

ESI, kapiler bir tüp içerisinden düşük akış hızıyla (1-10 µL.min⁻¹) geçen bir sıvıya, düşük basınçta uygulanan kuvvetli bir elektriksel alanın uygulanmasıdır. Bu elektriksel alan, yaklaşık 0.3-2 cm aralıkla duran kapiler ile elektrot arasında 3-6 kV kadar bir potansiyel fark uygulanması ile 10⁶ V m⁻¹ mertebelerinde elde edilmektedir.

Kapilerin ucundaki sıvı yüzeyinde bu elektriksel alan vasıtasıyla bir yüklenme gerçekleşerek, bu yüzeyin küçük parçalara bölünmesi ile yüklenmiş damlacıklar elde edilmektedir. Bu damlacıklar daha sonra ısıtılmış bir soygaz veya ısıtılmış bir

kapilerden geçirilerek, bulundurdukları son kalan çözücünden uzaklaşmaları sağlanır.

Sprey bir başlangıç voltajı ile başlamakta olup, çözücünün yüzey gerilimine bağlı olarak değişmektedir. Bir kaynaktan bu değerlerin su için 4 kV (yüzey gerilimi 0.073 N.m⁻²), metanol için 2.2 kV (yüzey gerilimi 0.023 N.m⁻²), asetonitril için 2.5 kV (yüzey gerilimi 0.030 N.m⁻²) ve dimetilsülfoksit için 3 kV (yüzey gerilimi 0.043 N.m⁻²) olarak verilmiştir [102].

Büyük moleküllerden elde edilen iyonlar, eğer yapılarında birden fazla iyonlaşabilen bölgelere sahiplerse, daha fazla yük taşımaktadırlar. ESI yönteminin en karakteristik özelliği, büyük moleküllerden çoklu yüklere sahip iyonlar oluşturabilmesidir. İyon oluşumu burada elektrokimyasal bir süreç olup, probun ucunda gerçekleştiğinden ötürü, örnek miktarından çok derişime karşı daha çok hassasiyeti söz konusudur.

2.4.4. Kütle Ayırıcıları

Gaz fazında iyonlar oluştuktan sonra, bunların kütlelerine göre ayrılmaları gereklidir. Bir kütle ayırıcısındaki iyonların tayin edildiği fiziksel özellikleri m/z yani kütle/yük oranlarıdır. Buradaki en önemli nokta, birden fazla yüke sahip olan iyonların m/z değerlerinin, gerçek kütlelerinin fraksiyonel bir kısmı olmasıdır.

Kütle/yük oranına göre iyonların ayrılması, çeşitli ilkelere dayanmaktadır (Tablo 2.3). Tüm kütle ayırıcıları analiz sırasında statik veya dinamik olan elektriksel veya manyetik alan, ya da her ikisini birden kullanmaktadır [95].

Kütle Ayırıcısı	Sembolü	Ayırma prensibi
Elektrik sektör	E veya ESA	Kinetik enerji
Manyetik sektör	B	Momentum
Kuadrupol	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)

Tablo 2.3. Kütle spektrometrisinde kullanılan kütle ayırıcısı türleri.

Bir kütle ayırıcısının performansını belirleyen beş tane parametre söz konusudur:

1. Kütle aralığı limiti

Kütle aralığı, bir kütle ayırıcısının m/z cinsinden ölçebildiği limiti belirlemektedir. T_h veya u cinsinden, $z=1$ kabul edilerek ifade edilir.

2. Analiz hızı

Analiz hızı, aynı zamanda tarama hızı, kütle ayırıcısının belli bir kütle aralığında ölçüm yaptığı hız anlamındadır. Saniye başına düşen kütle birimi ($u.s^{-1}$) veya milisaniye başına düşen kütle birimi ($u.ms^{-1}$) olarak ifade edilir.

3. Geçirgenlik

Geçirgenlik, detektöre ulaşan iyon sayısının kütle ayırıcısına ulaşan iyon sayısına oranıdır.

4. Kütle doğruluğu

Kütle doğruluğu, kütle ayırıcısının belirlediği m/z değerinin doğruluğu olarak ifade edilir. Milikütle birimi (mmu) veya ppm cinsinden ifade edilir.

5. Ayırıcılık

Ayırıcılık, bir kütle ayırıcısının birbirini arasında çok küçük m/z farkı olan iki iyon adına farklı sinyaller vermesidir. Sinyalin tepe noktasının yarı yükseklik değerindeki genişliği (FWHM) ya da $m/\Delta m$ cinsinden ifade edilir.

	Basınç	İyon örnekleme	Doğruluk	Ayrılcılık (m/z 1000)	Kütle Aralığı (Th)
Kuadrupol	10 ⁻⁵ Torr	Sürekli	100 ppm	2000	4000
İyon Tuzağı	10 ⁻³ Torr	Pulsu	100 ppm	4000	6000
TOF	10 ⁻⁶ Torr	Pulsu	200 ppm	5000	>1 000 000
TOF Refletron	10 ⁻⁶ Torr	Pulsu	10 ppm	20 000	10 000
Manyetik Alanlı	10 ⁻⁶ Torr	Sürekli	<10 ppm	100 000	20 000
FTICR	10 ⁻¹⁰ Torr	Pulsu	<5 ppm	500 000	30 000
Orbitrap	10 ⁻¹⁰ Torr	Pulsu	<5 ppm	100 000	50 000

Tablo 2.4. Kütle ayırıcıları ve özellikleri

2.4.4.1. Kuadrupol Kütle Ayırıcısı

Paul ve Steinweger [103] tarafından 1953'te Bonn Üniversitesi'nde ilk olarak prensipleri açıklanmıştır. Kuadrupol kütle ayırıcısı, salınım yapan elektriksel alanların kararlılığını kullanarak, iyonları m/z oranlarına göre ayırmaktadır.

Kuadrupol ayırıcıları [104, 105] dairesel veya hiperbolik dört bölümden oluşan çubuklardan oluşmaktadır. Bu çubukların birbirlerine mükemmel bir biçimde paralellik sağlaması gerekmektedir.

Pozitif yüklü bir iyon bu çubukların arasındaki boşluğa girdiği zaman, iyon negatif çubuğa doğru çekilir. Eğer iyon çubuk üzerinde boşalım yapmadan önce potansiyel değiştirilirse, iyon da yön değiştirmektedir.

Z-ekseni üzerinde hareket eden iyonlar üzerine, potansiyel uygulanan çubuklardan oluşan kuadrupol tarafından uygulanan toplam elektriksel alanın etkisi:

$$\Phi_0 = +(U - V \cos \omega t) \text{ ve } -\Phi_0 = -(U - V \cos \omega t) \quad (\text{Eşitlik 2.4})$$

olarak ifade edilir. Bu denklemde, Φ_0 çubuklara uygulanan potansiyeli, ω açısal frekansı (radyan/saniye cinsinden = $2\pi\nu$, burada ν , RF alana ait frekansı belirtmektedir), U direk potansiyeli ve V, RF voltajının yüksekliğini ifade etmektedir. Genellikle U değeri 500 ila 2000 V arasında değişirken, V değeri 0 ila 3000 V arasında değişmektedir.

2.4.4.2. Uçuş-Zamanlı Kütle Ayırıcısı (TOF)

1946'da Stephens [106] tarafından ilk olarak açıklanan ve Wiley ve McLaren tarafından 1955'te dizayn edilen ilk doğrusal TOF kütle spektrometresi, ilk olarak ticarileştirilen cihaz olmuştur [107].

TOF ayırıcısı, bir elektriksel alan tarafından hızlandırıldıktan sonra, uçuş kanalı adı verilen alansız bir bölgedeki hızlarına göre iyonları ayırmaktadır. Tüm iyonlar aynı miktarda kinetik enerjiye sahip olduklarından, hızlarının dağılımına göre ayrılmaktadırlar.

Kütle/yük oranları, kaynaktan detektöre kadar bir iyonun ulaştığı sürenin ölçülmesi ile hesaplanır. Kaynaktan ayrılmadan önce, m kütesine ve $q = ze$ toplam yüküne sahip bir iyon, V_s potansiyeli ile hızlandırılır. Elektriksel potansiyel enerjisi E_{el} , kinetik enerjiye E_k dönüşür:

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV_s = zeV_s = E_{el} \quad (\text{Eşitlik 2.5})$$

Kaynaktan ayrılan iyonun hızı, üstteki denklem düzenlenerek:

$$v = (2zeV_s/m)^{1/2} \quad (\text{Eşitlik 2.6})$$

olarak ifade edilir. İlk hızlanmadan sonra, iyon sabit hızda düz bir doğrultuda detektöre doğru yol alır. L uzunluğunu t zamanda katetmesi:

$$t = \frac{L}{v} \quad (\text{Eşitlik 2.7})$$

olarak ifade edilir. Bu ifadede V yerine üstteki denklem konulduğunda:

$$t^2 = \frac{m}{z} \left(\frac{L^2}{2eV_s} \right) \quad (\text{Eşitlik 2.8})$$

ifadesi elde edilir. Son elde edilen ifadeye göre, m/z oranı t^2 'ye bağlı bir denklem olup, parantez içerisine yazılan ifade sabittir. Ayrıca bu ifadeden çıkarılacak yorum, bir iyonun kütleli azaldıkça, detektöre daha hızlı ulaşacağıdır.

Prensip olarak, TOF ayırıcısının üst limiti olmaması, onu yumuşak iyonlaşma kaynakları için çok uygun kılmaktadır. Örneğin, 300 kDa üzerindeki kütleler MALDI-TOF ile analiz edilebilmiştir [108, 109].

TOF ayırıcılarının analiz hızı çok hızlı olup, geniş bir kütle aralığını çok kısa bir süre içerisinde analiz edebilmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Deney aşamasında yapısında siyalik asit grubu bulunduran transferrin proteini (insan serumundan), proteinlerin enzimatik parçalanmasında kullanılan tripsin, asetonitril, ditiyotreitil (DTT), iyodoasetamid, deneysel çalışmalar süresince kullanılan tüm metal oksitler (gadolinium (III) oksit, titanyum (IV) oksit, tantal (V) oksit, zirkonum (II) oksit, nikel (II) oksit ve demir (III) oksit, üre, glikolik asit Sigma (Steinheim, Almanya) firmasından ve trifloroasetik asit (TFA) Riedel-de Haen (Seelze, Almanya) firmalarından sağlanmıştır.

Tripsin ile parçalanmış proteinlerden gelen peptitlerdeki siyalik asit gruplarını yapıdan ayırmak için kullanılan PNGase F enzimi New England Biolabs (Ipswich, İngiltere) firmasından alınmıştır

MALDI kütle spektrometresi analizleri için örnek hazırlama sırasında kullanılan 2.5-dihidroksi benzoik asit (DHB) matriksi ve proteinlerin enzimatik parçalanmaları sırasında ortam pH'sını uygun değerlere ayarlamak için kullanılan amonyum bikarbonat tuzu Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından alınmıştır

Tüm deneysel çalışmalarda hazırlanan sulu çözeltilerde 18.2 M.Ω.cm dirence sahip deiyonize su kullanılmıştır (Puris Expe-Ultrapure Water System, Mirae St Co. Ltd., Kore).

3.2. Kullanılan Cihazlar

3.2.1. pH Metre

Analizler öncesi gerekli tüm pH ayarlamaları küçük hacimler (mikrolitre) kullanılması nedeniyle mikro pH metre olan Mettler Toledo-Seven Multi pH metre (Mettler Toledo, İsveç) cihazı ile yapılmıştır.

3.2.2. Vorteks

Deneyler sırasında gerekli olan karıştırma işlemlerinde Heidolph-Reax Cotrol Vortex (Heidolph, Almanya) cihazı ile yapılmıştır.

3.2.3. Dondurarak Kurutma Cihazı

ESI-MS analizleri öncesi transferrin proteininin saflaştırılması ve çözücü değişimi için Alpha 1-2 LD Plus (Christ, Almanya) cihazı kullanılmıştır.

3.2.4. Santrifüj

Deneylerde gerçekleştirilen tüm yıkama işlemleri MPW Medical Instruments Yüksek Hızlı Fırçasız Santrifüj (High Speed Brushless Centrifuge) (MPW, Çin) cihazı ile yapılmıştır.

3.2.5. MALDI Kütle Spektrometresi

Analizler sırasında tüm kütle spektrumları, Voyager-DE™ PRO MALDI-Uçuş Zamanlı (TOF)-Kütle Spektrometresi (Applied Biosystems, Amerika) ile alınmıştır. Sistemde 337 nm dalga boyunda azot lazeri (Spectra Physics, USA) kullanılmış ve analiz sırasında lazer şiddeti düzgün bir iyonlaşma için uygun değerlere getirilerek değiştirilmiştir. Analizler süresince kütle spektrometresi içindeki vakum 5×10^{-8} torr civarında tutulmuş ve iyonların hızlandırılması için 20 kV potansiyel uygulanmıştır. Spektrumlar doğrusal modda ve 300 lazer vuruşu sonucunda alınmıştır. Kütle hatalarını engellemek için kütle spektrometresi anjiyotensin (1296.5 g/mol), bradakinin (1060.2 g/mol) ve insulin (5733.5 g/mol) ile kalibre edilmiştir. Son olarak tüm veriler bilgisayara kaydedilmiştir.

3.2.5.1. MALDI Kütle Spektrometresi Analizleri İçin Örnek Hazırlama

Yapılan çalışmalarda peptit analizleri için 2,5-dihidroksibenzoik asit (%1 TFA içeren, 1:1 ACN/Su karışımında, 14 mg/mL derişiminde) MALDI matriksinin çözeltisi hazırlanmıştır. Enzimatik olarak parçalanmış protein örneklerinin çözeltilerinden 1 µL alınarak MALDI plakasının üzerindeki analiz gözeneklerine uygulanarak kurutulmuşlardır. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanan MALDI matriksi, plaka üzerine daha önce uygulanan peptitlerin üzerine 1 µL koyulmuştur. Gözenekler üzerine uygulanan peptit-matriks karışımı açık havada kurutulup kristallendikten sonra MALDI kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir.

3.2.6. HPLC

Enzimatik olarak parçalanmış protein örneğinin peptit analizleri için ESI-MS/MS cihazına verilmeden önce peptit birimlerinin ayrılması için Agilent 1200 Series Quarternary HPLC (Palo Alto, ABD) sistemi kullanılmıştır. Ayırma için 150 mm uzunluğunda, iç çapı 3 mm, por çapı 3 um olan Zorbax Eclipse XDB, ters faz C18 kolonu kullanılmıştır. Derecelendirilmiş ayırma programı Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Zaman (dk)	Su (%)	Asetonitril (%)
0	100	0
2	100	0
10	55	45
15	55	45
22	10	90
27	0	100

Tablo 3.1 HPLC için gradient ayırma programı.

3.2.7. ESI Kütle Spektrometresi

Yapılan çalışmalarda tüm analizler Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF-MS (Palo Alto, ABD) cihazı kullanılarak yürütülmüştür. Peptitlerin analizleri sırasında kütle spektrometresi parametreleri Tablo 3.2’de verilmiştir. Analizler Otomatik MS/MS modunda gerçekleştirilmiştir.

Gaz Sıcaklığı	350 °C
Kurutucu Gaz	12 L/min
Nebilözör Gaz	60 psi
Kapiler Voltaj	4000 V
Fragmantör Voltaj	175 V
Nozzel Voltaj	300 V
Skimmer Voltaj	100 V
Enjeksiyon Hacmi	3 uL

Tablo 3.2 ESI-MS analizleri için cihazın çalışma parametreleri.

3.3. Enzimatik parçalama

Metal oksit kullanılarak yapılan siyalik asit içeren glikopetitleerin zenginleştirme çalışmalarında model protein olarak transferrin proteini kullanılmıştır. Transferrin proteini yapısında siyalik asit içeren oligosakkarit birimlerini içermektedir. Bu proteinin seçimli parçalanması için proteomiks çalışmalarında en çok kullanılan tripsin enzimi kullanılmıştır. Tripsin enzimi parçalama işlemi sırasında proteinin arjinin ve lizin aminoasitlerinin karboksil grubu uçlarından parçalayarak analizler için daha küçük peptit birimlerine ayrılmışlardır. Böylece transferrin proteinine ait siyalik asit içeren glikopeptitler elde edilmiştir.

Enzimatik parçalama sırasında kullanılan 8.0 M Üre, 1.0 M DTT ve 200 mM iyodoasetamid, 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içinde hazırlanmıştır. 1 mg proteine 20 µL Üre çözeltisi eklenip çözülmüştür. Bu çözeltiliye 1 µl DTT eklenerek 37 °C 'de 1 saat bekletilmiştir. Bir saat sonunda protein çözeltisine 20 µL iyodoasetamid ve 4 µL DTT eklenerek karanlık ortamda 1 saat bekletilmiştir. Bu işlemde sonra enzimatik parçalama için protein çözeltisi 60 µL amonyum bikarbonatla seyreltilmiş ve 1 µg/µL tripsin çözeltisinden 20 µl eklenip 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra protein çözeltisi 900 µL amonyum bikarbonat çözeltisi ile seyreltilip -24 °C' de zenginleştirme ve kütle spektrometrisi analizleri için saklanmıştır.

3.4. Glikopeptitlerin zenginleştirme işlemi

Enzimatik parçalama işlemi ile alt peptit birimlerine ayrılmış transferrin proteinin, Zirkonyum (IV) oksit, Tantal (V) oksit, Titanyum (IV) oksit, Nikel (II) oksit, Gadolinyum (III) oksit ve Demir (III) oksitleri kullanılarak zenginleştirme işlemi yapılmıştır. Her bir metal oksitten 10 mg tartılıp bir ependorfa alınmıştır. Metal oksitler üzerine yükleme tamponu olarak 2.0 M glikolik asit içeren ACN:Su:TFA (80:15:5, v/v) çözeltisinden 40 uL eklenmiştir. Bu karışım içerisine enzimatik olarak parçalanmış transferrin proteini çözeltisinden 20 µL eklenip 30 dakika vorteks ile karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonrası metal oksit-peptit karışımı ile iki kez 1 mL ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v), 1 mL su ile ve bir kez 1 mL ACN ile 1 kez yıkanmıştır. Desorpsiyon işlemi için metal oksitler üzerine pH=11.0'de amonyak / amonyum bikarbonat tamponu eklenerek 15 dakika süresince vorteks ile karıştırılmıştır. Bu

işlemden sonra karışım santrifüj edildikten sonra çözeltiler kütle spektrometrisi analizleri için -24 °C'de saklanmışlardır.

3.5. Zenginleştirme Ortamındaki pH'nın Değişim Etkisinin İncelenmesi

Siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirmesinde ilk aşama olan yükleme işleminde, yükleme tamponun pH'sının adsorpsiyona etkisini incelemek için çözeltiler farklı pH'lara çekilmiştir. Standart olarak 2.0 M glikolik asit içeren ACN/Su (80:20, v/v) çözeltisinin pH'sı 2.80 civarındadır. pH=0.30, 1.00 ve 2.00'a inmek için çözeltiler derişik TFA ile seyreltilmiş, pH=3.00 ve 4.00'a çıkmak için ise derişik NH₃ eklenmiştir.

3.6. Glikolik Asit Derişiminin Değiştirilmesi

Yükleme tamponundaki Glikolik asit derişiminin adsorpsiyona etkisini incelemek amacıyla yükleme tamponu olarak kullanılan ACN/Su/TFA (80:15:5, v/v) çözeltilerinin glikolik asit derişimleri, glikolik asitsiz, 1.00 M, 2.00 M, ve 3.00 M olacak şekilde değiştirilmiştir.

3.7. Yıkama Çözeltilerinin Değiştirilmesinin Etkisinin İncelenmesi

Metal oksit üzerine tutunmayan peptitlerin desorpsiyon öncesi ortamdaki uzaklaştırılması için farklı içerikte yıkama çözeltileri hazırlanmıştır. Birinci yıkama işlemi iki kez 1 mL ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki kez 1 mL ACN:Su:TFA, (20:80:0.1, v/v) ile, ikinci yıkama işlemi iki kez 1 mL ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki kez 1 mL Su:TFA (100:0.1, v/v) ile, üçüncü yıkama işlemi iki kez 1 mL ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki kez 1 mL ACN:TFA (100:0.1, v/v) ile, dördüncü yıkama işlemi iki kez 1 mL ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v), bir kez 1 mL ACN:TFA (100:0.1, v/v) ve bir kez 1 mL ACN:TFA (100/0.1, v/v) ile, ve son olarak beşinci yıkama işlemi iki kez 1 mL ACN/Su/TFA (80/19/1, v/v) ile, bir kez 1 mL %100 Su ile ve bir kez 1 mL %100 ACN ile yapılmıştır.

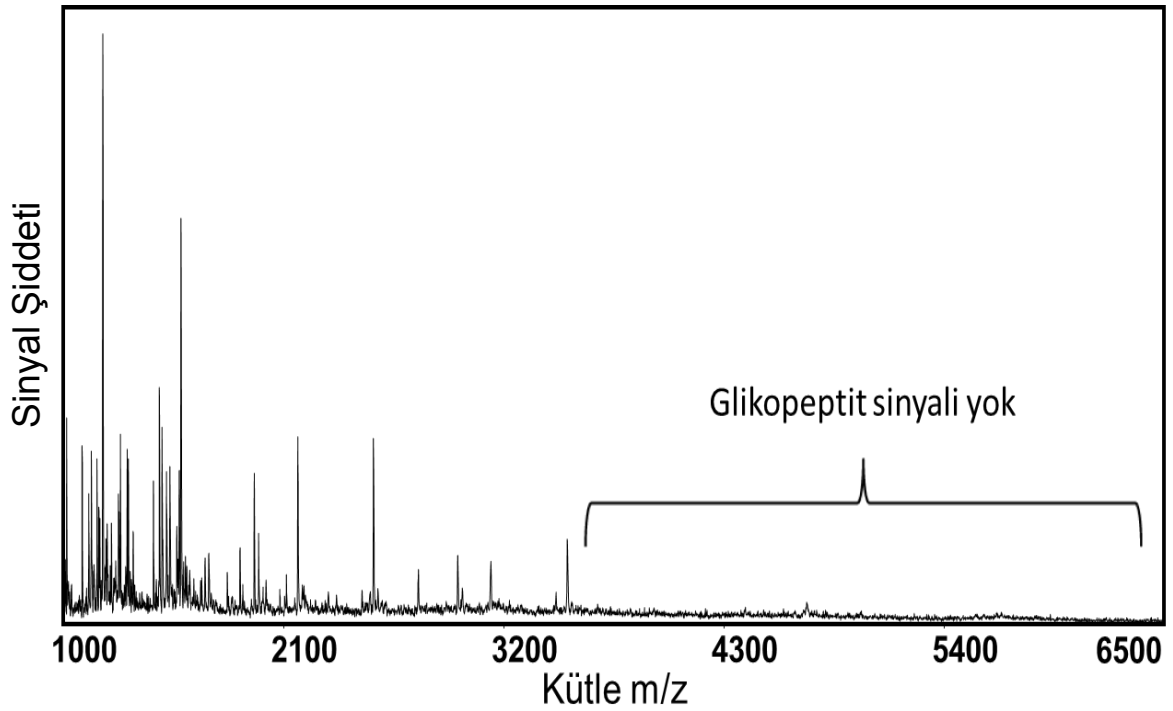
3.8. PNGase F enzimi ile parçalama işlemi

Siyalik asit içeren glikopeptitler metal oksit ile zenginleştirildikten sonra PNGase F enzimine maruz bırakılmışlardır. Bu işlem öncesinde zenginleştirme çözeltisine dondurmali kurutma işlemi yapılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan glikopeptitler 1U PNGase F enzimi içeren 20 µL 50 mM NH₄HCO₃ çözeltisi içerisinde 37 °C'de su banyosunda bir gece bekletilmiştir. Elde edilen çözeltinin herhangi bir ilave saflaştırma işlemi yapılmaksızın kütle spektrometrik tekniklerle analizi gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

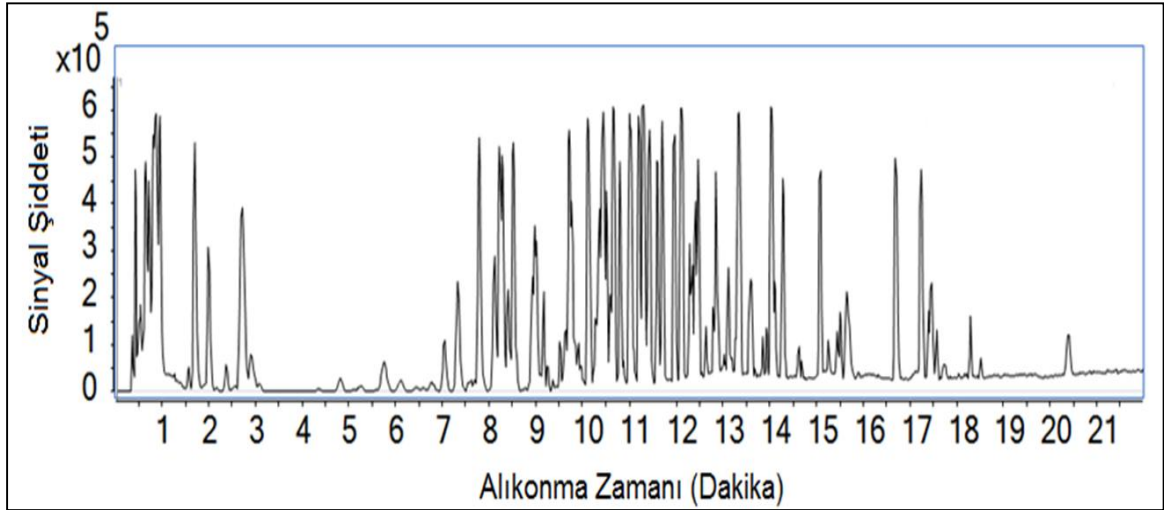
4.1. Transferrin Proteinin Enzimatik Parçalanma Ürünleri

Yapısında üzerindeki oligosakkaritlerde siyalik asit grubu bağlı olan transferrin proteini, tripsin enzimi ile enzimatik olarak parçalandıktan sonra MALDI-MS ile ortaya çıkan peptitler analiz edilmiştir. Şekil 4.1' de görüldüğü gibi 1000-3000 Dalton arası üzerinde herhangi bir oligosakkarit grubu bulundurmayan peptitler bulunmaktadır. Oligosakkarit grubu bulunan peptitler 3500 Dalton'dan 6000 Daltona kadar çıkmaktadır ve enzimatik parçalanma ürünlerinde herhangi bir glikopeptit sinyaline rastlanmamaktadır.



Şekil 4.1. Transferrin proteinin enzimatik parçalanma sonucundaki peptitlerin MALDI-MS spektrumu.

Analiz sonucunda, spektrumda hiçbir glikopeptit gözlenmemiştir. Bunun nedeni parçalanma sonucunda ortaya çıkan glikopeptit miktarlarının, üzerinde herhangi bir oligosakkarit grubu taşımayan peptitlere göre çok az olmasıdır.



Şekil 4.2. Human Transferrin'in proteolitik parçalanma sonucunda peptitlerinin ters faz sıvı kromatografisi kullanılarak ayrılması sonucu elde edilen kromatogramı.

Search parameters

MS data file: HT Digest 5.3.13_1.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)

Protein sequence coverage: 84%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MRLAVGALLV	CAVLGLCLAV	PKDTRV WCAV	SEHEATKCQS	FRDHMKSVIP
51	SDGPSVACVK	KASYLDCIRA	IAANEADAVT	LDAGLVYDAY	LAPNNLKPVV
101	AEFYGSKEDP	QTFYYAVAVV	KKDSGFQMNQ	LRGKKSCHTG	LGRSAGWNIP
151	IGLLYCDLPE	PRKPLEKAVA	NFFSGSCAPC	ADGTDFFQLC	QLCPGCGCST
201	LNQYFGYSGA	FKCLKDGAGD	VAFVKHSTIF	ENLANKADR	QYELLCLDNT
251	RKPVDEYKDC	HLAQVPSHTV	VARSMGGKED	LIWELLNQAQ	EHFGKDKSKE
301	FQLFSSPHGK	DLLFKDSAHG	FLKVPPRMDA	KMYLGYEYVT	AIRNLREGTC
351	PEAPTDECKP	VKWCALSHHE	RLKCDEWSVN	SVGKIECVSA	ETTEDCIAKI
401	MNGEADAMSL	DGGFVYIAGK	CGLVPVLAEN	YNKSDNCEDT	PEAGYFAIAV
451	VKKSASDLTW	DNLKGKKSCH	TAVGRTAGWN	IPMGLLYNKI	NHCRFDEFFS
501	EGCAPGSKKD	SSLCKLCMGS	GLNLCEPNNK	EGYYGYTGAF	RCLVEKGDVA
551	FVKHQTVPQN	TGGKNPDPWA	KNLNEKDYEL	LCLDGTRKPV	EYANCHLAR
601	APNHAVVTRK	DKEACVHKIL	RQQQHLFGSN	VTDCSGNFCL	FRSETKDLLF
651	RDDTVCLAKL	HDRNTYEKYL	GEEYKAVGN	LRKCSTSSLL	EACTFRRP

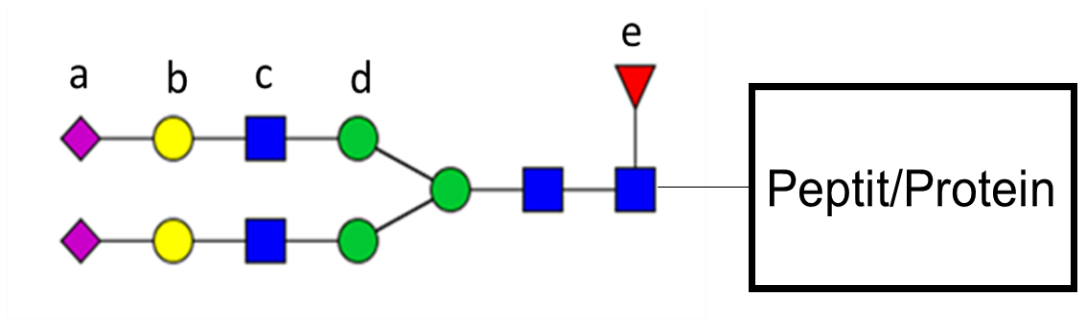
Şekil 4.3. Transferrin proteininin enzimatik parçalanma sonrası LC-MS/MS analizinde Mascot veri tabanı kullanılarak elde edilen protein dizilimi. Kırmızı renk ile gösterilenler eşleşmiş peptit birimlerine siyah ile gösterilenler eşleşmemiş peptit birimlerini göstermektedir.

Şekil 4.2’de görülen kromatograma oto MS/MS uygulaması yapıldı. Buradan elde edilen veriler swissprot veritabanında tarandı. Elde edilen verilere göre transferrin glikoproteininin aminoasit dizilimi % 84 oranında tespit edilmiştir. Her ne kadar yüksek bir oranda dizilim tespit edilse dahi glikolizasyona uğrayan aminoasit barındıran iki peptit bölgesi Q⁶²²QQHLFGSN⁶³⁰VTDCSGNFCLFR⁶⁴² ve C⁴²¹GLVPVLAENYN⁴³²K⁴³³ tespit edilememiştir. Bunun nedeni her iki peptitinde glikozilasyon bölgesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu iki peptitin analiz edilebilmesi için ilave zenginleştirme veya enzimatik parçalama işlemlerine tabii tutulması gerekmektedir.

4.2. Sıyalik Asit Grubu İçeren Glikopeptitlerin Zenginleştirilmesi İçin En Uygun Metal Seçimi

Sıyalik asit grubu içeren glikoproteinler biyolojik çevrimlerdeki süreçlerde önemli bir göreve sahiptirler ve bu yapıların analizleri, olan veya oluşabilecek hastalıkların belirlenmesi için hayati bir öneme sahiptir. Bu amaçla transferrin proteininden elde edilen glikopeptitlerin, oligosakkarit grubu içermeyen peptitlerin arasından zenginleştirme işlemleri için farklı metal oksitler ile zenginleştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla nikel (II) oksit, zirkonyum (II) oksit, tantal (V) oksit, titanyum (IV) oksit, gadolinyum (III) oksit ve demir (II) oksit zenginleştirme işlemleri için literatürde kullanılan zenginleştirme yöntemi kullanılarak en uygun metal oksit belirlenmiştir [110, 111].

Transferrin proteini üzerinde iki adet glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır. Bunların her ikisi de N-Glikozilasyon bölgesidir. Bu oligosakkarit gruplarının bağlı olduğu aminoasitler 432. ve 630. sırada bulunan asparajin aminoasitlerinin amin grubu üzerinden bağlanmıştır. Bu bağlı grupların yapısı Şekil 4.4’ de gösterilmiştir.

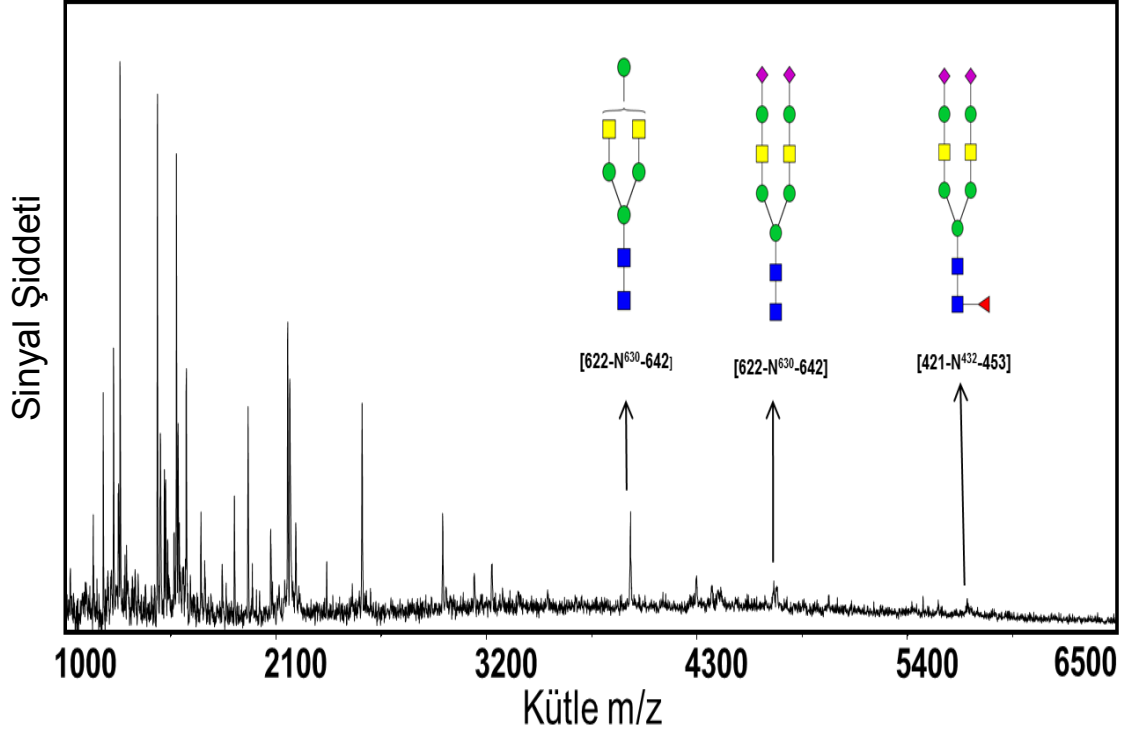


Şekil 4.4. Transferrin proteini üzerindeki N-Glikozasyon bölgelerinden bağlanmış oligosakkarit grubu.(a) Sialik asit, (b) Galaktoz, (c) N-Asetilglukozamin, (d) MannoZ, (e) Fukoz

Bu grup yapısında dört adet N-Asetilglukozamin (GlcNAc), üç adet mannoz (Man), iki adet galaktoz (Gal), 1 adet fukoz (Fuc) ve 2 adet siyalik asit (Neu5Ac) bulundurmaktadır.

4.2.1. Gadolinium (III) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları

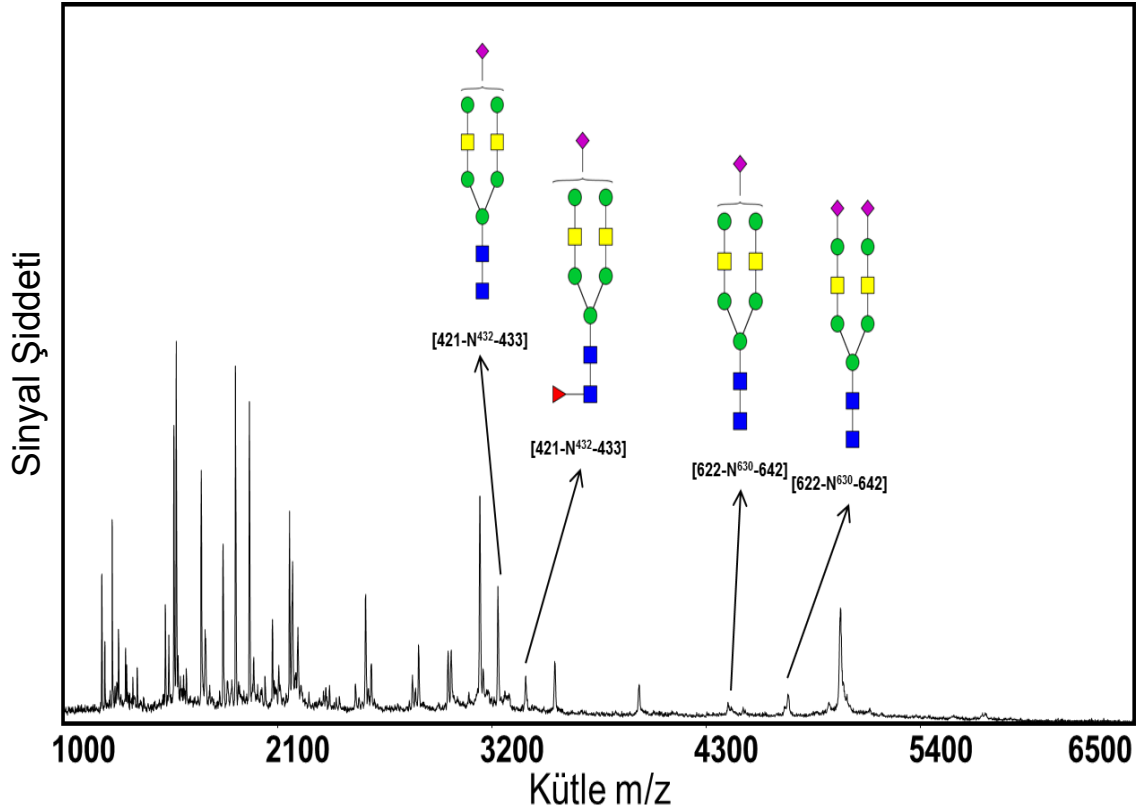
Zenginleştirme çalışmalarında ilk olarak gadolinium (III) oksit kullanılmıştır. Bu amaçla literatürde siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirilmesinde metal oksitler için belirtilen yöntem kullanılarak Şekil 4.5'deki MALDI kütle spektrumu 2,5-dihidroksi benzoik asit matriksi kullanılarak elde edilmiştir [110, 111].



Şekil 4.5. Gadolinyum (III) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.

Gadolinyum (III) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrasındaki desorpsiyon çözeltisinin analizinde (Şekil 4.5) sadece transferrin proteinin enzimatik parçalaması sonucu ortaya çıkan normal peptitler gözlemlenmiştir. 3500 Dalton'dan sonra gözlenmesi gereken siyalik asit içeren glikopeptitler burada sinyal vermemiştir. Gadolinyum (III) oksit siyalik asit içeren glikopeptitlerle herhangi bir etkileşime girmemiş olup sadece yapısında asidik aminoasitleri içeren peptitlere ilgi duymuştur. Bu nedenle hem seçicilik hem de özgünlük açısından bu metal oksit, zenginleştirme işlemi için uygun değildir.

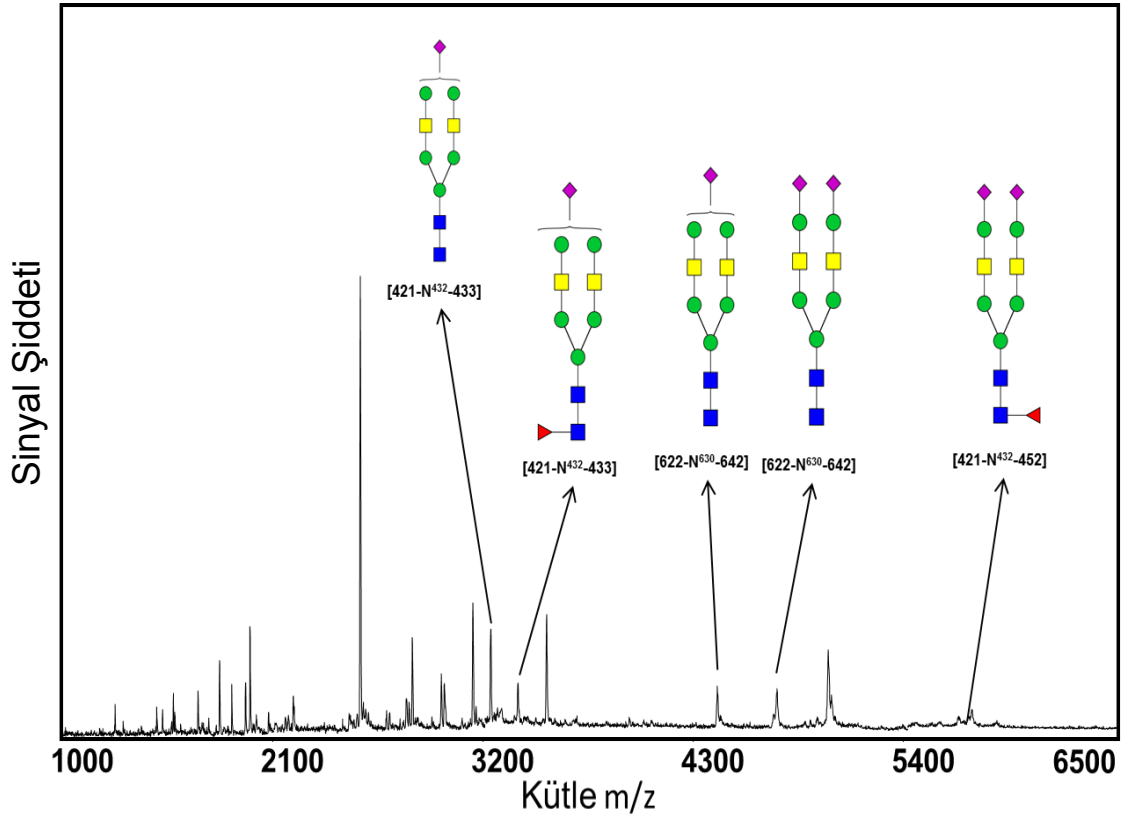
4.2.2. Titanyum (IV) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları



Şekil 4.6. Titanyum (IV) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.

Şekil 4.6'da Titanyum (IV) oksit ile yapılan deneylerin analiz sonucunda insan transferrin proteininden elde edilen glikopeptitler spektrumunda belirlenmiştir. 1000-3200 Dalton arasında bulunan oligosakkarit grubu içermeyen peptitler fazla sayıda görülmektedir. 432. ve 630. aminoasitlerden bağlı oligosakkarit grubu içeren peptitler titanyum (IV) oksit kullanılarak tespit edilmiştir. Titanyum (IV) oksit literatürde glikopeptit zenginleştirilmesi için oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat literatürdekinden farklı bir yöntem olarak yaptığımız çalışmalarda geliştirilen yöntemlerde çok seçici olarak davranmadığı belirlenmiştir [112]. Bu sonuçlardan dolayı Titanyum (IV) oksit ile seçici ve etkin olarak siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirilmesi için tercih edilmemiştir.

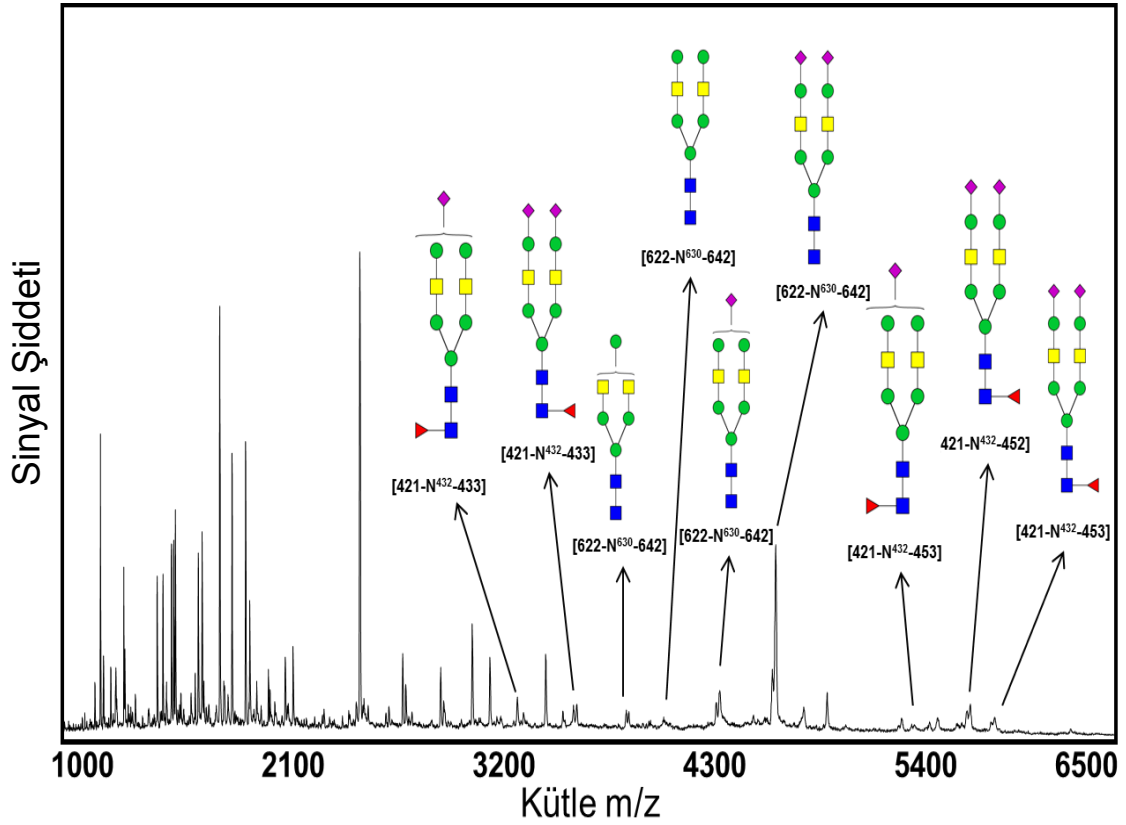
4.2.3. Tantal (V) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları



Şekil 4.7 Tantal (V) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.

Şekil 4.7’de verilen spektrumda Tantal (V) oksit üzerinden desorbe edilen peptitlerin spektrumunda insan transferrin proteinine ait siyalik asit içeren glikopeptitler gözlenmektedir. Fakat transferrin proteininden gelen oligosakkarit grubu içermeyen peptitlerin sayısı ise nispeten yüksektir. Ayrıca siyalik asit içeren glikopeptitlerin sinyal şiddetleri diğer metal oksitler ile kıyaslandığında oldukça düşüktür. Bu nedenlerden dolayı Tantal (V) oksit glikopeptitlerin zenginleştirilmesi için uygun bir ajan olduğu ancak özgülüğünün daha artırılabilceği söylenebilir.

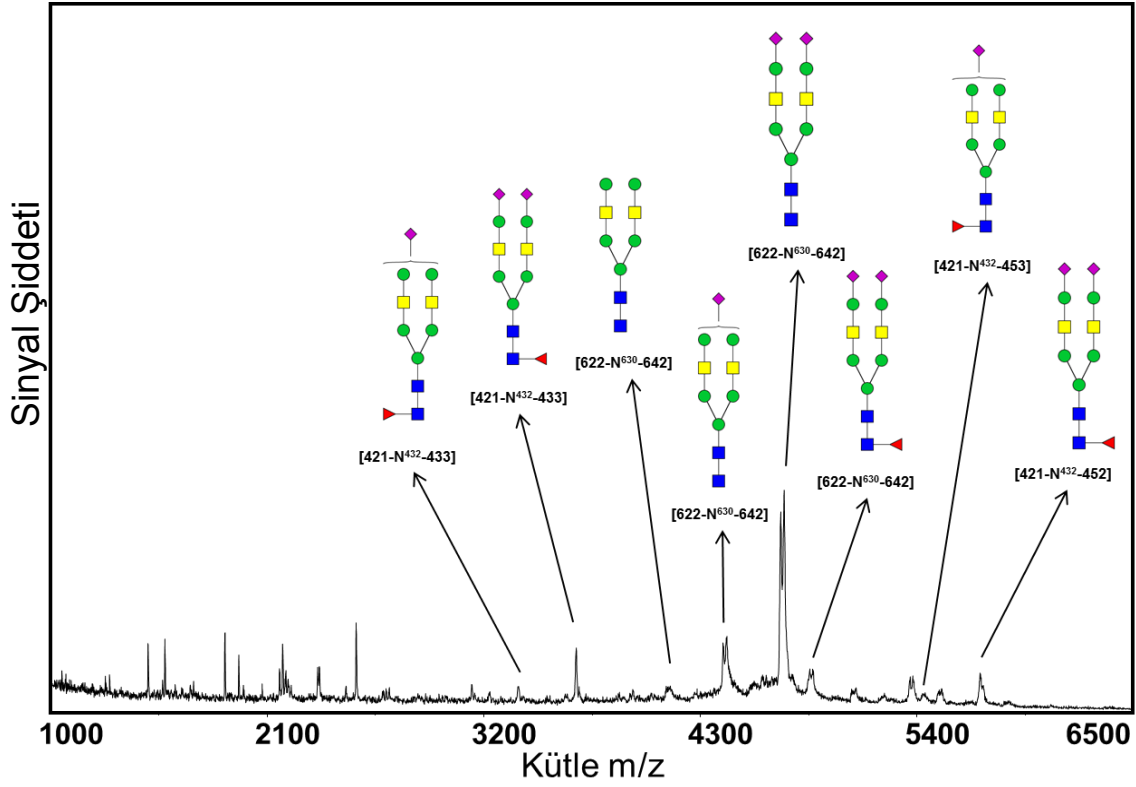
4.2.4. Zirkonyum (II) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları



Şekil 4.8 Zirkonyum (II) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.

Şekil 4.8 'de Zirkonyum (II) oksit ile zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinde transferrine ait glikopeptitler gözlenmiştir fakat oligosakkarit grubu içermeyen peptitlerin sayıları glikopeptitlere oranla oldukça fazladır. Zirkonyum (II) oksit' in seçicilik bakımından iyi bir glikopeptit zenginleştirme ajanı olmadığı söylenebilir fakat siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirilmesinde alternatif bir malzeme olarak kullanıldığı literatürde mevcuttur [113].

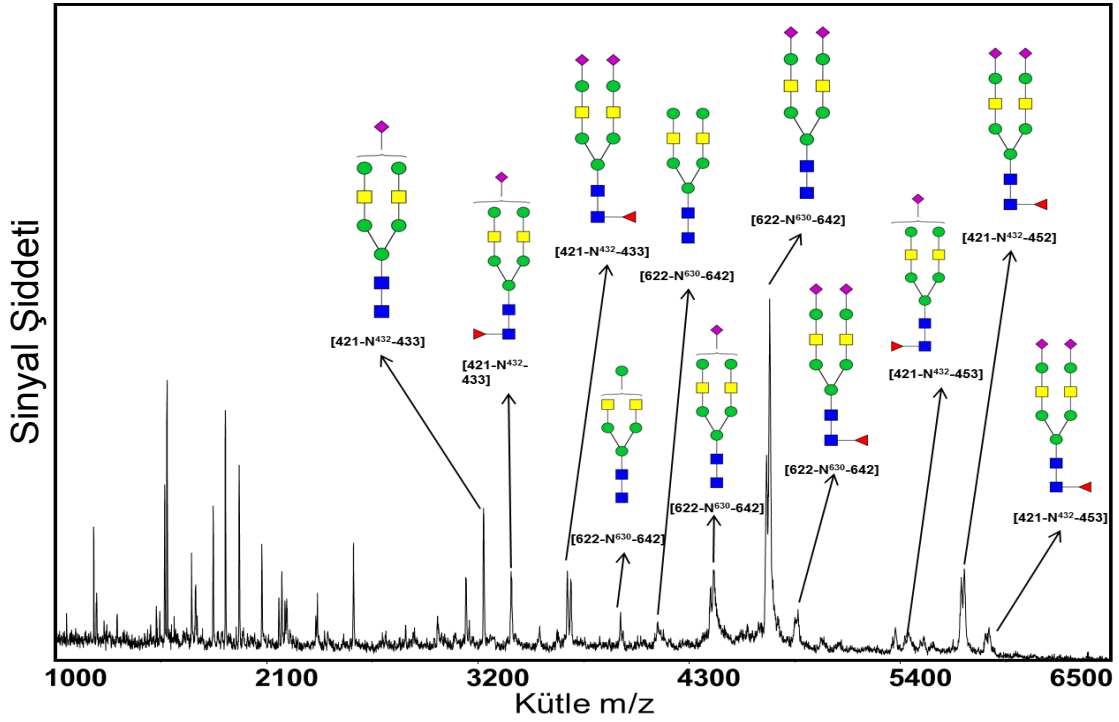
4.2.5. Nikel (II) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları



Şekil 4.9. Nikel (II) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.

Zenginleştirme sonrası Nikel (II) oksit desorpsiyon çözeltisinden elde edilen spektrumda (Şekil 4.9) transferrine ait glikopeptitler gözlenmektedir. Ayrıca kullanılan yöntem ile özgün olarak siyalik asit içeren glikopeptitlere ilgi duyulmaktadır. Fakat diğer metal oksitlerle karşılaştırıldığında zenginleştirme veriminin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca nikel (II) oksitin asidik ortamda çözünmesinden dolayı madde kayıpları yaşanmıştır. Bu sebepten bu metal oksit glikopeptit zenginleştirilmesi için uygun bir ajan olarak görülmemiştir. Buna rağmen nikel (II) oksit bu tarz çalışmalarda kullanılabilir.

4.2.6. Demir (III) Oksit Kullanılarak Yapılan Zenginleştirme Çalışmaları

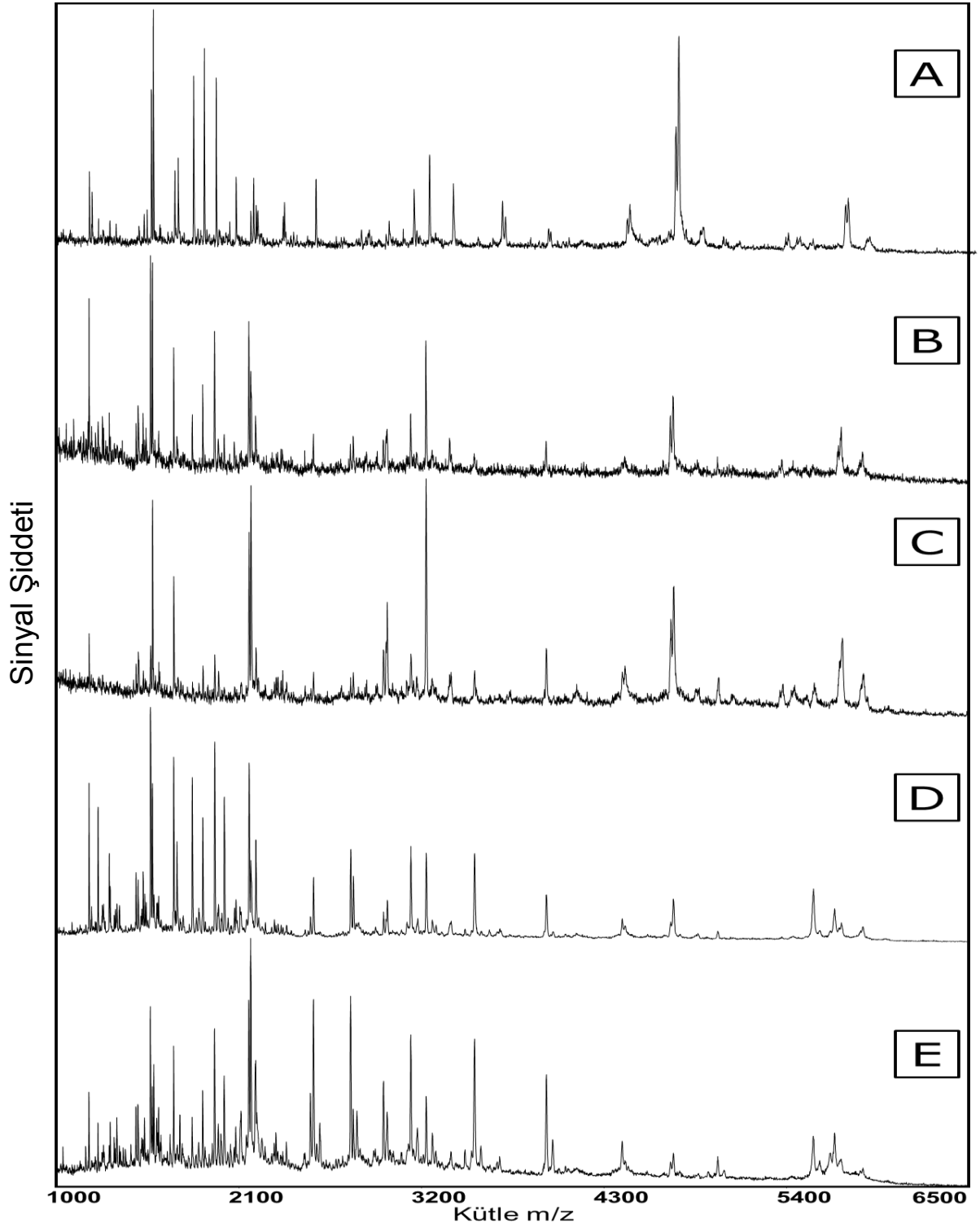


Şekil 4.10. Demir (III) oksit ile yapılan zenginleştirme sonrası desorpsiyon çözeltisinin MALDI-MS spektrumu.

Son olarak glikopeptitlerin zenginleştirme işlemi demir (III) oksit kullanılarak yapılmıştır (Şekil 4.10). Desorpsiyon sonrası elde edilen çözeltinin analizinde siyalik asit içeren glikopeptitlerin sinyalleri yüksektir. Asn-432 ve Asn-630 peptitleri üzerinden bağlanan şekerlerin tam yapıları gözükmemektedir. Analiz sırasında şeker grupları lazer enerjisine maruz kalarak parçalandığından birçok farklı oligosakkarit yapısında glikopeptit sinyalleri belirlenmiştir. Bu peptitler üzerlerine peptitlerin oligosakkarit grupları çizilerek gösterilmiştir. Denenen diğer metaller ile karşılaştırıldığında, demir (III) oksit'in siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirilmesinde hem seçicilik hem de verimlilik açısından iyi bir ajan olduğunu söylenebilir.

4.3. Siyalik Asit Bağlı Glikopeptitlerin Zenginleştirme Çalışmaları için En Uygun pH'nın Belirlenmesi

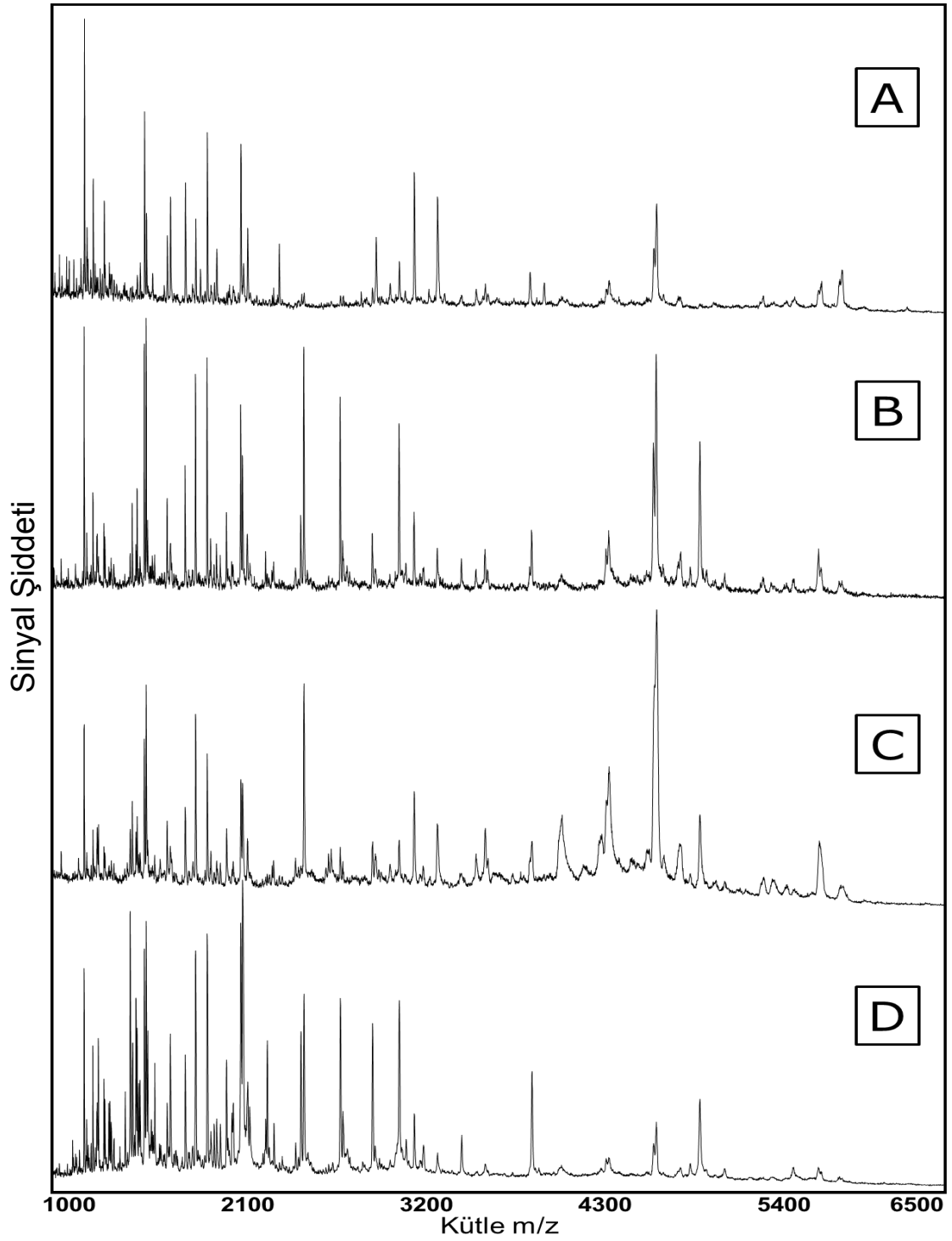
Demir (III) oksit ile yapılan çalışmalarda, glikopeptitlerin metal oksit yüzeyine tutunabilmesi için uygun pH, iyonik şiddet ve polaritede çalışılması gerekmektedir. Bu amaçla adsorpsiyon ve desorpsiyon ortamlarının optimize edilmesi gerekmektedir. Siyalik asit içeren glikopeptit çalışmaları için en uygun metal oksit seçildikten sonra glikopeptit sinyallerinin en iyi gözlenebileceği koşulların optimizasyon çalışmalarına başlanmıştır. İlk olarak pH'ın adsorpsiyona etkisini incelemek için yükleme tamponununun pH'sı değiştirilerek (pH=0.30, 1.00, 2.00, 3.00, ve 4.00'da) deneyler yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar Şekil 4.11 (A,B,C,D,E)'de verilmiştir. Şekil 4.10 (A)'da pH=0.30'da yükleme yapıldığındaki desorpsiyon çözeltisine ait spektrum gözlenmektedir. Burada transferrin proteinine ait glikopeptit sinyalleri net bir şekilde gözlenmektedir. Buna ilave olarak bu proteine ait diğer peptit sinyalleri de görülmüştür. Şekil 4.10 (B,C,D,E) spektrumlarında, yükleme pH'ları sırasıyla 1.00, 2.00, 3.00 ve 4.00 olarak ayarlanmıştır. Spektrumlar incelendiğinde, pH'nın artmasıyla demir (III) oksit'in siyalik asit içeren glikopeptitlere olan ilgisinin azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, transferrin proteinine ait diğer peptitlerin sayısında oldukça fazla bir artış belirlenmiştir. Bu sonuçlar metal oksitin siyalik asit içeren glikopeptitlere bağlandığı adsorpsiyon koşullarının oldukça düşük pH'da olduğunu göstermektedir. Buradaki etkileşim tam olarak aydınlatılmamakla beraber titanyum (IV) oksit kullanılarak yapılan çalışmalarda siyalik asidin karboksil grubu ile metal oksitin metal merkezi arasında tersinir çok dişli bir bağlanma mekanizması önerilmektedir [110].



Şekil 4.11. Demir (III) oksit yüzeyine farklı pH'larda yükleme yapıldıktan sonraki desorpsiyon çözeltilerinin MALDI-MS spektrumları. (A) pH=0.30' da, (B) pH=1.00'da, (C) pH=2.00'da, (D) pH=3.00'da ve (E) pH=4.00'da.

4.4. Glikolik Asit Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi

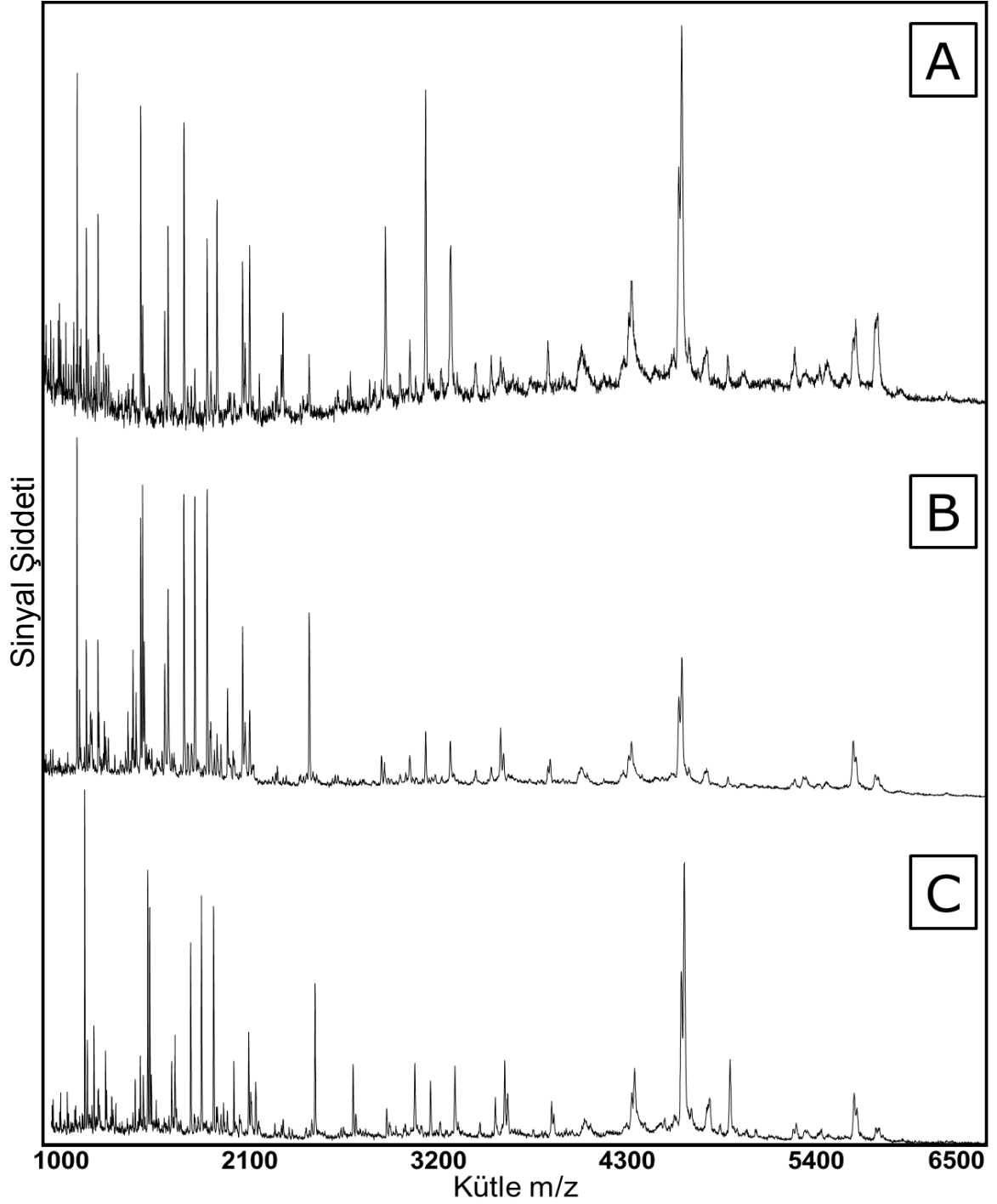
Siyalik asit içeren glikopeptilerin zenginleştirme çalışmalarında bu çalışmalar için en uygun metal oksit belirlendikten sonra, kullanılan metal oksitin en seçici ve verimli çalışacağı koşulların belirlenmesi çalışmalarına tutunma çözeltisinin içeriğinde değişiklikler yapılarak devam edilmiştir. Bu hedefle tutunma çözeltisi için en uygun pH belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra transferrin proteinine ait diğer peptitlerin yüzeye tutunmasını engellemek amacıyla literatürde de kullanılan glikolik asit çözeltisi tutunma çözeltisine çeşitli oranlarda ilave edilmiştir. Glikolik asit pKa'sı 3.86 olan bir alfa-hidroksi asittir. Bu özelliklerinden dolayı transferrine ait asidik aminoasitler içeren diğer peptitlerle yarışarak yüzeye tutunmalarını engellemektedir. Çalışmada glikolik asitin etkisini incelemek amacıyla literatürde bulunan yöntem kullanılarak çeşitli derişimlerde glikolik asit içeren tutunma çözeltileri hazırlanmıştır [111]. Şekil 4.12 (A,B,C,D) MALDI kütle spektrumları, tutunma çözeltisinde içerdiği glikolik asit derişimine göre sırasıyla glikolik asit olmadan, 1.00, 2.00 ve 3.00 M glikolik asit kullanılarak elde edilmiştir. Buradaki spektrumlar karşılaştırıldığında glikolik asit içermeyen tutunma çözeltisi kullanıldığında siyalik asit içeren glikopeptitlere ait sinyaller oldukça düşük olarak belirlenmiştir. Ayrıca diğer sıradan peptitlerin sayısı oldukça artmıştır. Glikolik asit miktarı 1.00 M'a çıkarıldığında ise nispeten seçilim artmıştır. 2.00 M glikolik asit içeren spektrum (Şekil 4.12C) incelendiğinde seçiciliğin ve sinyal şiddetinin arttığını diğer peptitlerle kıyaslama yapıldığında görülmektedir. 3.00 M glikolik asit miktarının ise hem seçiciliği hem de sinyal şiddetini düşürdüğünü spektrumlar kıyaslama yapılarak belirlenmiştir. Buradan elde edilen sonuçlara göre 2.00 M glikolik asit içeren tutunma çözeltisinin siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirme çalışmaları için en uygun olduğu tespit edilmiştir.



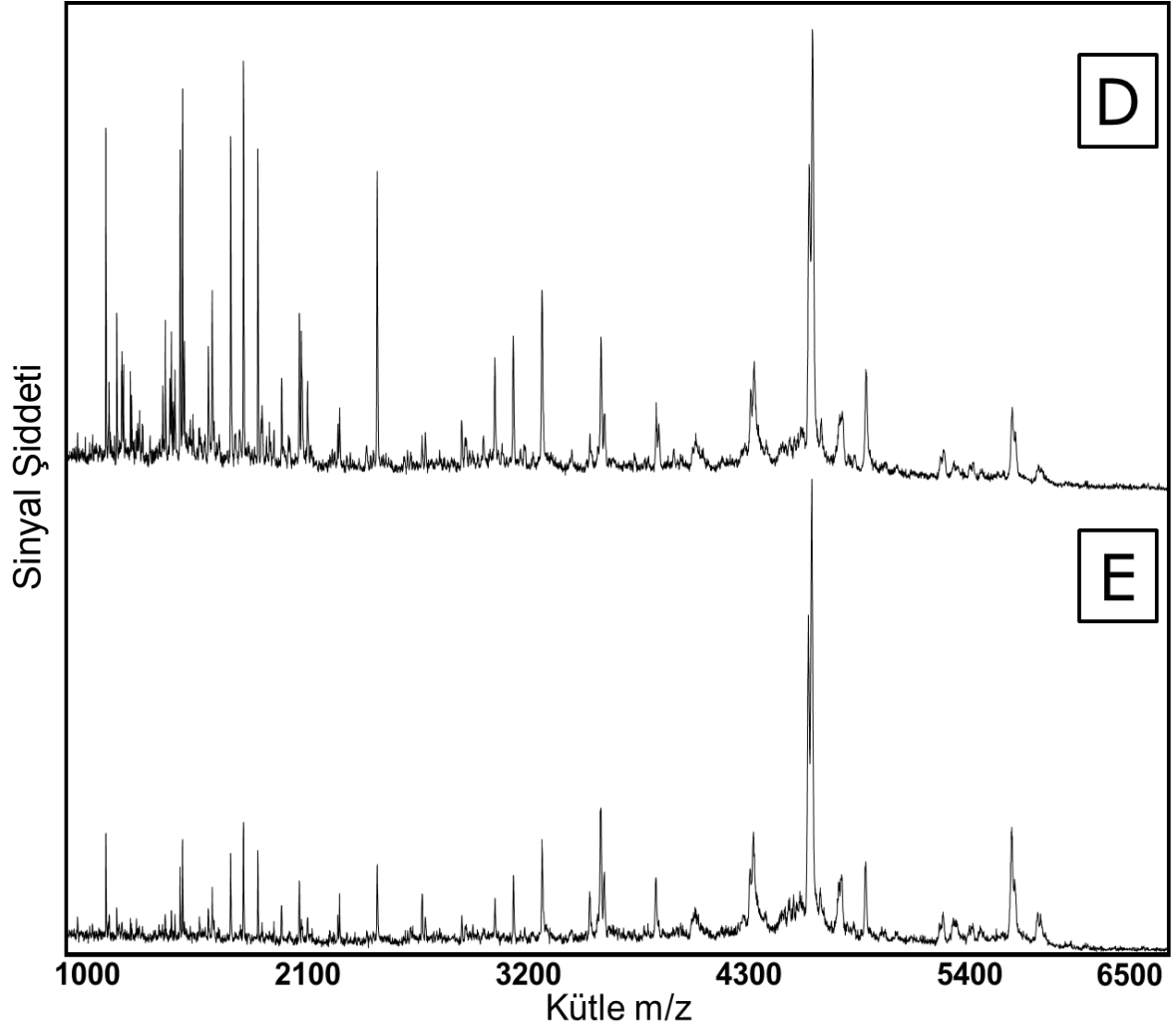
Şekil 4.12. Demir (III) oksit üzerine yükleme yapılan çözeltinin farklı glikolik asit derişimleri ve desorpsiyon sonrası MALDI-MS spektrumları (A) Glikolik asit olmadan, (B) 1.00 M, (C) 2.00 ve (D) 3.00 M.

4.5. Zenginleştirme İşlemi Sonrası En İyi Yıkama Çözeltisinin Belirlenmesi

Demir (III) oksit ile siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirme çalışmalarında tutunma çözeltisinin en uygun pH'sı ve seçiciliği artırarak glikolik asidin derişimi belirlendikten sonra, ortamdaki uzaklaştırılması istenen ve yüzeye tutunan sıradan peptitlerin hızlı bir şekilde desorbe olabilmesi için çeşitli yıkama çözeltileri bu çalışmada kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak literatürde kullanılan yöntemlere göre yıkamalar yapılmıştır [110]. Şekil 4.13'te A spektrumu bu yıkamalar yapılarak elüsyon sonrasında elde edilen MALDI kütle spektrumudur. Bu spektrum incelendiğinde siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştiği ancak sıradan peptitlerin sayısında gözle görülür bir düşüşün sağlanamadığı tespit edilmiştir. Bu yıkama işlemi dereceli olarak pH'nın ve polaritenin artırılmasını hedefleyerek diğer peptitlerin yüzeyden koparılmasını hedeflemektedir. Bu aşamadan sonra öncelikle sırasıyla ikinci yıkamalar ACN:Su:TFA (100:0:0.1, v/v) ve ACN:Su:TFA (0:100:0.1, v/v) ile iki defa yapılarak zenginleştirme işlemi yapılmış ve sırasıyla Şekil 4.13'teki B ve C spektrumları elde edilmiştir. Bu iki spektrum kıyaslandığında anlamlı bir farklılık elde edilememiştir ve diğer peptitlerin sayısında önemli bir azalma sağlanamamıştır. Bu denemeler sonrasında ikinci yıkama işlemi sırasıyla bir defa Su:TFA (100:0.1, v/v) ve bir defa ACN:TFA (100:0.1, v/v) ile yapılmıştır. Şekil 4.13D spektrumu bu yıkamalar yapılarak kullanılan zenginleştirme metodu sonucunda elde edilmiştir. Bu spektrum incelendiğinde seçicilik açısından önemli bir gelişme sağlanamamıştır. Bu aşamadan sonra yıkama çözeltilerinin pH'sı biraz daha yukarı çekilerek metal oksitler % 100 ACN ve % 100 Su ile yıkanmıştır. Bu yöntem kullanılarak yapılan zenginleştirme en iyi sonucu vermiştir. Seçicilik açısından en iyi spektrum Şekil 4.13E'de görülmektedir. Transferrine ait sıradan peptitlerin en iyi uzaklaştığı ve bu sayede siyalik asit içeren glikopeptitlerin en net görüldüğü spektrum belirtilen yıkama çözeltileri kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Desorpsiyon öncesi farklı yıkama çözeltileri sonrası desorpsiyon çözeltilerinin MALDI-MS spektrumları (A) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki defa ACN:Su:TFA (20:80:0,1, v/v) ile (B) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki defa ACN:Su:TFA (0:100:0,1, v/v) ile (C) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ve iki defa ACN:Su:TFA (100:0:0,1, v/v) ile.



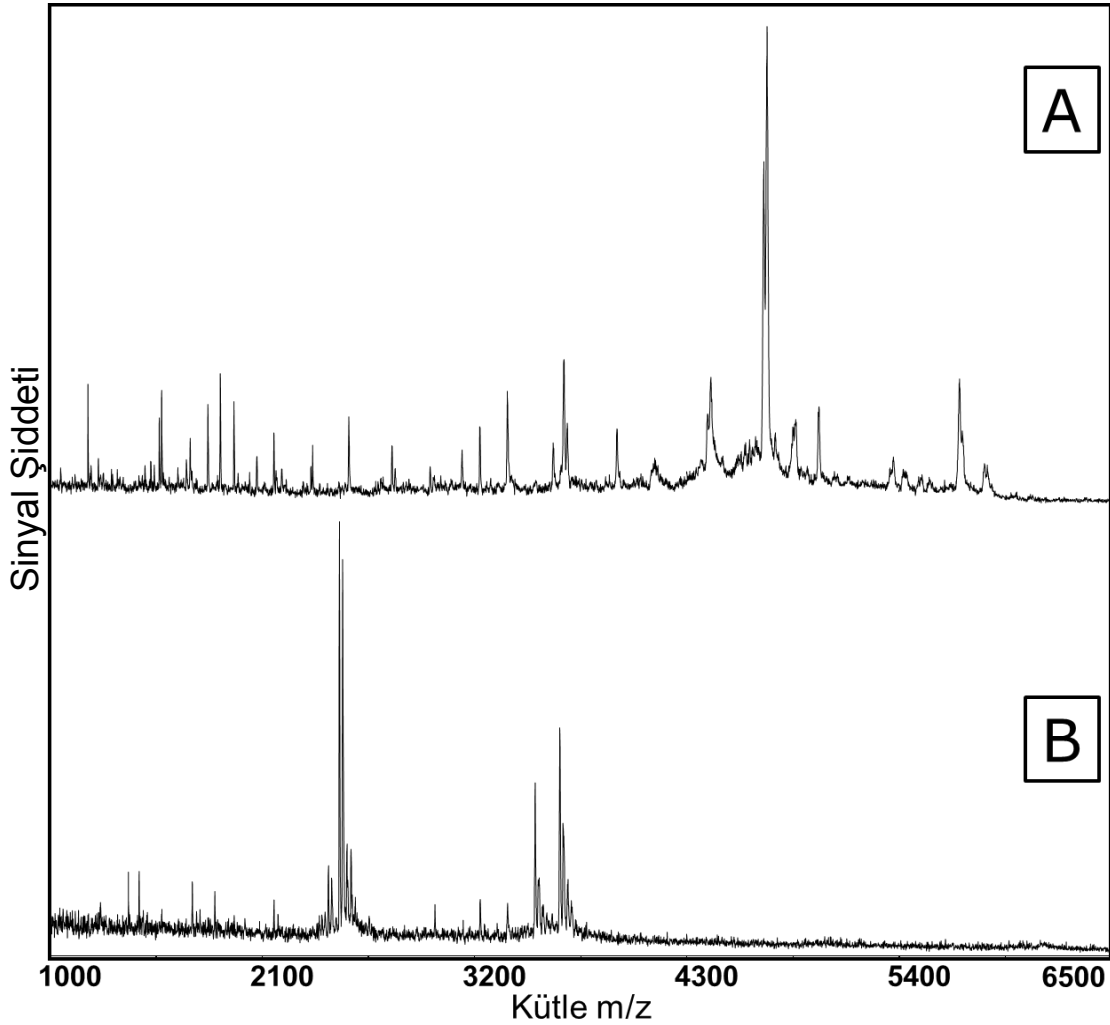
Şekil 4.13. (Devamı) Desorpsiyon öncesi farklı yıkama çözeltileri sonrası desorpsiyon çözeltilerinin MALDI-MS spektrumları (D) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v), bir defa Su:TFA (100:0,1, v/v) ve bir defa ACN/TFA (100:0.1, v/v) ile (E) İki defa ACN:Su:TFA (80:19:1, v/v) ile, bir defa %100 Su ve bir defa %100 ACN ile.

4.6. Zenginleştirme İşlemi Sonrası PNGase F Enzimi ile Peptitlerden Şeker Gruplarının Uzaklaştırılması

Zenginleştirme işleminden sonra siyalik asit içeren glikopeptitlerin peptit bölgelerinin özgün analizleri için PNGase F enzime maruz bırakılmaları gerekmektedir. PNGase F, N-bağlı glikoproteinleri en sondaki GlcNAc ve arparajin arasından hidroliz yoluyla kesen bir amidaz enzimidir [114].

Demir (III) oksit ile zenginleştirilen glikopeptitler PNGase F enzime maruz bırakılarak peptit birimleri bölgesel olarak tespit edilmiştir. Burada enzimin özgünlüğü sayesinde oligosakkarit yapılarından ayrılan glikopeptitlerin peptit birimleri analiz edilmiştir. Bu sayede kullanılan yöntem ile transferrinin hem peptit birimleri hem de oligosakkarit birimleri tespit edilmiştir. Transferrine ait iki adet glikozilasyon bölgesi MALDI-MS analizlerinde belirlenmiştir. Şekil 4.14 B 'de görülen MALDI kütle spektrumu, zenginleştirilen glikopeptitlerin PNGase F enzime maruz bırakılarak analiz edilmesi sonucu elde edilmiş spektrumunu göstermektedir. Spektrum incelendiğinde bir eksik kesim noktasına sahip N⁴³² glikozilasyon bölgesi içeren CGLVPVLAENYN⁴³²KSDNCEDTPEAGYFAIAVVKK peptiti ve CGLVPVLAENYN⁴³²KSDNCEDTPEAGYFAIAVVK peptiti, N⁶³⁰ glikozilasyon bölgesine sahip QQQHFLFGSN⁶³⁰VTDCSGNFCLFR peptiti ve bu peptitlere ait sinyallerde sodyum ve potasyum eklenmiş halleri gözlenmektedir. Tripsin enzimi proteomiks çalışmalarında özgünlüğü nedeniyle proteinlerin enzimatik parçalanma basamağında sıklıkla kullanılmaktadır. Tripsin genellikle bir proteini arjinin ve lizin aminoasitleri arasından parçalayarak peptit birimlerini oluşturur. Her ne kadar özgün olsa da bazı durumlarda eksik kesim noktası verebilmektedir. Glikozilasyon bölgelerinin peptit birimlerine bakıldığında N⁴³² bölgesi için asparajin amino asidini lizin amino asidi izlemektedir. Normal olarak lizin amino asidinin bulunduğu bölgeden protein bölgesi kesilerek CGLVPVLAENYN⁴³²K peptitinin elde edilmesi beklenmektedir fakat lizin amino asidinin öncesinde bulunan glikozilasyon bölgesi nedeniyle tripsin enzimi sterik etki sebebiyle bu bölgeden peptit birimini kesememektedir. Şekil 4.14 A da gösterilen zenginleştirme sonrası glikopeptitler içeren MALDI-MS spektrumu ile enzimle şeker birimleri özgün olarak kesilip tekrar alınan MALDI-MS spektrumu (Şekil 4.14 B) karşılaştırıldığında daha saf bir spektrumun oluştuğu söylenebilmektedir. Şekil 4.14 A da elde edilen MALDI-MS spektrumunun düşük kütle bölgelerinde gözlenen ve diğer özgün olmayan

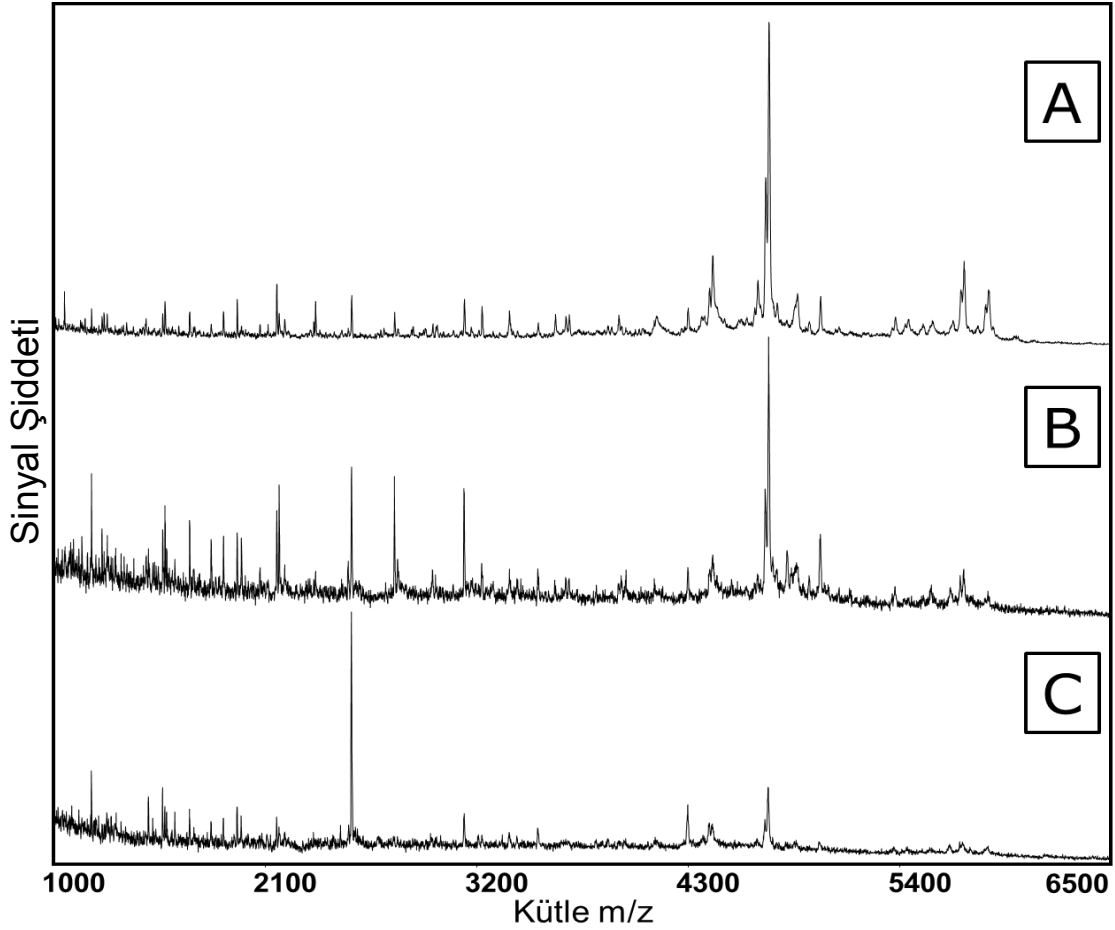
peptitlerden oluştuğu daha önce yorumlanan sinyallerin esasında özgün enzim ile şekerler peptitlerden ayrıldıktan sonra gözlenmemektedir (şekil 4.14 B). Bu ise düşük molekül ağırlığı bölgesinde gözlenen sinyallerin özgün olmayan peptitlerden değilde glikopeptitlerin kararsızlığı sonucu MALDI-MS şartlarında paralanmalarından oluşan parçalanma ürünlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bu çalışmada uygulanan yöntemin oligopeptitlerin zenginleştirmesinde gerçekten çok daha özgün çalıştığını göstermektedir.



şekil 4.14. (A) Demir (III) oksit ile zenginleştirme sonrası desorpsiyon zeltisinin MALDI-MS spektrumu, (B) Zenginleştirme işlemi sonrası desorpsiyon zeltisinin, PNGase F enzimi ile etkileşimi sonrası MALDI-MS spektrumu.

4.7. Farklı Derişimlere Sahip Glikopeptitlerin Zenginleştirilmesi

Transferrin proteininin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin enzimatik parçalanma sonrası zenginleştirmelerinin MALDI-MS sonuçları Şekil 4.15'de verilmiştir. Şekil 4.15 A ve B'de verilen spektrumlarda transferrin proteininden zenginleşmiş siyalik asit bağı glikopeptitler rahatlıkla görülebilmektedir. Şekil 4.15 C'de derişim 0.10 pmol μL^{-1} ye inildiğinde siyalik asit bağı glikopeptitler halen gözükmemektedir.



Şekil 4.15. Transferrin proteininin farklı derişimlerdeki zenginleştirme çözeltilerinin MALDI-MS spektrumları. (A) 10 pmol μL^{-1} , (B) 5 pmol μL^{-1} , (C) 0.10 pmol μL^{-1} .

Yapılan ileri çalışmalar sonucu sabit miktardaki metal oksit (10 mg) üzerine yükleme çözeltisi hacmi ve desorpsiyon çözeltisi hacmi arasında 100:1 oranı sağlanarak yapılan zenginleştirmelerde yukarıda belirtilen zenginleştirme oranları da 100 kat daha artırılarak femtomol 'ün alt seviyelerine, yani 10^{-3} pmol seviyelerine kadar diğer peptitlere göre çok daha düşük derişimlerde bulunan glikopeptitleri karmaşık matriks içerisinde tayin etme olasılıkları doğmaktadır. Bu konudaki ileri çalışmalarda kan

serumu gibi çok sayıda protein bulunduran ve bazılarını çok düşük derişimde içeren ve çok sayıda glikolizasyon bölgesi olan proteinlerden oluşacak yüzlerce glikopeptiti ayırıp analiz etmektir. Daha sonra bu peptitlerden özgün enzimle şekerleri uzaklaştırıp MS/MS çalışmaları yapıp proteinlerdeki glikolizasyon oranlarını bulup bazı hastalıklarda teşhis amacı ile kullanmaktır.

Bu tez kapsamında siyalik asit içeren glikopeptitlerin kütle spektrometrik tekniklerle hızlı ve etkin analizlerinde kullanılabilecek birçok metal oksit test edilmiştir. Literatürde bu amaçla genellikle titanyum (IV) oksit kullanılmaktadır. Titanyum (IV) oksit kullanılarak hem serumdan hem de hücre örneklerinden siyalik asit içeren glikopeptitler zenginleştirilerek sıvı kromatografisi bağlı ileri kütle spektrometrik tekniklerle analiz edilmişlerdir [111, 115, 116]. Metal oksitler kullanılarak siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirme çalışmaları gün geçtikçe çeşitlenerek artmaktadır. Palmisano ve arkadaşları hidrofilik etkileşim ve titanyum dioksit kromatografisi kullanılarak HeLa hücrelerinden siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirmesini göstermiştir [111]. Yapmış oldukları bu çalışmayı çeşitli doğal örnekler kullanarak ve yeni yöntemlerle geliştirerek literature kazandırmışlardır [117]. 2013 yılında Zhu ve arkadaşları insan plazmasını kullanarak titanyum (IV) oksit ile siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirmesi için benzer bir yöntem kullanmışlardır [116]. Bu çalışmalarını yüksek etki değerine sahip dergilerde yayımlamışlardır. Burada yapılan her çalışma glikopeptitlerin analizinde gelişmekte olan bu alana katkı sağlamaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmalar titanyum (IV) oksite alternatif olabilecek diğer metal oksitlerin zenginleştirme performanslarını değerlendirmektedir. Burada literatürde şimdiye kadar bu çalışmalarda kullanılmamış metal oksitler siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirilmesinde kullanılmıştır ve zenginleştirme performansları karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda demir (III) oksitin alternatif bir malzeme olarak ilk kez siyalik asitlerin seçici olarak zenginleştirilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Demir (III) oksit kullanılarak daha karmaşık örneklerden siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirilmesi ile titanyum dioksitten daha seçici ve aynı zamanda paramanyetik özelliği ile çeşitli uygulamalarda kullanılabilecek bir yöntemin geliştirilebileceği standart glikoprotein olan insan transferrin üzerine yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca insan transferrin glikoproteininin kapsamlı olarak glikolizasyon analizleri yapılmıştır. Hem glikopeptit birimleri hem de peptit birimleri belirlenmiştir. Bu çalışma sayesinde

çeşitli hastalıklarda hayati rol oynayan siyalik asit içeren glikopeptitlerin alternatif metal oksitler ve özellikle demir (III) oksit kullanılarak seçici olarak zenginleştirildikten sonra ileri kütle spektrometrik tekniklerle analizlerinin yapılması, ilgili hastalıklara ön tanı koyulmasında ve tedavi sürecinde oldukça önemli katkılar sağlayacaktır.

5. SONUÇLAR

- Transferrin proteinin tripsin enzimi ile parçalanması sonucu elde edilen siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirme işlemleri için, gadolinyum (III) oksit, nikel (II) oksit, tantal (V) oksit, zirkonyum (IV) oksit, titanyum (IV) oksit ve demir (III) oksit ayrı ayrı kullanılmış ve analizleri MALDI-MS kullanılarak yapılmıştır.
- Enzimatik olarak parçalanan transferrin proteinin MALDI-MS sonucunda, spektrumda sadece oligosakkarit bölgesi olmayan normal peptitler görülmüştür. Buna sebep olarak enzimatik parçalanma sonucunda elde edilen peptit karışımı içerisinde glikopeptit miktarının çok az miktarda olduğu gösterilebilir.
- Enzimatik olarak parçalanan transferrin proteinin ESI-MS/MS analiz sonuçlarına göre, Mascot veritabanından elde edilen veriler incelendiğinde glikopeptitlerin miktarının toplam peptit miktarına oranla çok az olmasından ötürü glikopeptitler burada gözlemlenememiştir.
- Gadolinyum (III) oksit ile yapılan zenginleştirme çalışmalarına ait MALDI-MS sonuçlarında bu oksit yapısının siyalik asit içeren glikopeptit adsorpsiyon kapasitesinin çok düşük olduğu belirlenmiş bu metal oksit yüzeyinde glikopeptit gözlemlenememiştir.
- MALDI-MS sonuçlarında, tantal (V) oksit, zirkonyum (IV) oksit ve titanyum (IV) oksit ile yapılan deneylerde glikopeptitlerin zenginleştiği fakat seçicilik bakımından demir (III) oksite göre iyi performans göstermediği görülmüştür. Ancak bu metal oksitlerle elde edilen zenginleştirme sonuçlarının literatürde yapılan benzer türlerine göre çok daha etkili ve kullanışlı olduğu tespit edilmiştir.
- Siyalik asit içeren glikopeptitlerin zenginleştirilmesi çalışmalarında, nikel (II) oksit yükleme çözeltisi pH'sı asidik olduğundan deney sırasında çözünmüş ve bu malzemenin düşük pH'lara olan dayanıksızlığı nedeniyle zenginleştirme işlemi istenildiği şekilde gerçekleştirilememiştir.

- Tez kapsamında incelenen metal oksit türleri içerisinde demir (III) oksit zenginleştirme çalışmaları en iyi performansı göstermiş olup adsorpsiyon yeteneği en yüksek metal oksit türü olarak belirlenmiştir.
- Siyalik asit içeren glikopeptitlerin demir (III) oksit kullanılarak zenginleştirilmesinde kullanılan yükleme tamponu için en uygun pH değeri 0.30 olarak belirlenmiştir.
- Demir (III) kullanılarak yapılan zenginleştirme çalışmalarında yükleme tamponu içerisinde bulunan glikolik asit miktarına ait en uygun değer 2.00 M olduğu saptanmıştır.
- Siyalik asit içeren glikopeptitlerin demir (III) oksit yüzeyine adsorplandıktan sonra, adsorbanın yıkanması için en etkili çözeltilerin sırasıyla iki defa ACN:su:TFA (80:19:1, v/v) ile, bir defa %100 su ve bir defa %100 ACN olduğu belirlenmiştir.
- Zenginleştirilen siyalik asit içeren glikopeptitlerin desorpsiyonu pH = 11.0'de amonyum bikarbonat/amonyak tamponu kullanılarak yapılmıştır.
- Zenginleşen siyalik asit içeren glikopeptitler PNGase F enzimi ile oligosakkarit bölgelerinden kesilip, peptit bölgeleri MALDI-MS ile analiz edilmiştir. Bu deney sonuçları esasında düşük molekül ağırlığı bölgesindeki sinyallerin özgün olmayan peptitlerden değil özgün olan glikopeptitlerin parçalanmasından oluştuğunu göstermekte ve bu da yöntemin daha etkin çalıştığını göstermektedir.
- Tez kapsamında geliştirilen yöntem kullanılarak, 0.10 pmol μL^{-1} gibi çok düşük derişimlerdeki transferrin proteininden gelen siyalik asit içeren glikopeptitler başarı ile zenginleştirilmiştir. Bu gözlenebilme sınırı adsorpsiyon-desorpsiyon çözeltilerinin hacim oranları değiştirilerek 100 kat daha iyileştirilebilir.
- Tez kapsamında geliştirilen bu yöntem ile siyalik asit içeren glikoproteinler yüksek seçicilik ile zenginleştirilmiştir.
- Tayin sınırının altında kalan derişimlerdeki bulunan glikopeptitlerin tayini, peptit karışımı içerisinde yapılamazken tez kapsamında geliştirilen yöntem

kullanılarak siyalik asit içeren glikopeptitler zenginleştirilip tayini mümkün hale getirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F., From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis, *Biotechnology*, 14, 61–65, **1996**.
- [2] Pandey, A., Mann, M., Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, 405, 837-846, **2000**.
- [3] Pennisi, E., Modernizing the tree of life, *Science*, 300, 1692-1697, **2003**.
- [4] Mann, M., Jensen, O.N., Proteomic analysis of post-translational modifications, *Nature Biotechnology*, 21, 255-261, **2003**.
- [5] Seet, B.T., Dikic I., Zhou, M.M., Pawson, T., Reading protein modifications with interaction domains, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 473-483, **2006**.
- [6] Couldrey, C., Green, J.E., Metastases: the glycan connection, *Breast Cancer Research*, 2, 321-323, **2000**.
- [7] Hunter, T., Sefton, B.M., *Protein Kinase Classification. In Methods of Enzymology*; Hunter, T., Sefton, B.M., Eds., Academic Press: San Diego, Vol. 200, 3–37, **1991**.
- [8] Dass, C., *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, **2007**.
- [9] Klose, J., Kobalz, U., Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis*, 16, 1034–1059, **1995**.
- [10] Kelleher, N.L., Top-down proteomics, *Analytical Chemistry*, 76, 197A–203A, **2004**.
- [11] Lee, J.H., Kim, Y., Ha, M.Y., Lee, E.K., Choo, J., Immobilization of aminophenylboronic acid on magnetic beads for the direct determination of glycoproteins by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16, 1456–1460, **2005**.
- [12] Medzihradzky, K.F., Maltby, D.A., Hall, S.C., Settineri, C.A., Burlingame, A.L., Characterization of protein N-glycosylation by reversed-phase microbe liquid chromatography/electrospray mass spectrometry, complementary mobile phase and sequential exoglycosidase digestion, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5, 350–358, **1994**.
- [13] Kieliszewski, M.J., O’Neil, M., Leykam, J., Orlando, R., Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline O-arabinosylation, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 2541–2549, **1995**.

- [14] Hanisch, F.G., Green, B.N., Bateman, R.H., Peter-Katalinic, J., Localization of O-glycosylation sites of MUC1 tandem repeats by QTOF ESI mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 33, 358–362, **1998**.
- [15] Schauer, R., Sialic acids and their roles as biological masks, *Trends in Biochemical Sciences*, 10, 357-360, **1985**.
- [16] De Bruyn, P.P., Michelson, S., Changes in the random distribution of sialic acid at the surface of the myeloid sinusoidal endothelium resulting from the presence of diaphragmed fenestrae, *The Journal of Cell Biology*, 82, 708-714, **1979**.
- [17] Sillanaukee, P., Ponnio, M., Jaaskelainen, I.P., Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders, *European Journal of Clinical Investigation*, 29, 413–425, **1999**.
- [18] Romppanen, J., Eskelinen, M., Tikanoja, S., Mononen, I., Total and lipid bound serum sialic acid in benign and malignant breast disease, *Anticancer Research*, 17, 1249–1254, **1997**.
- [19] Paszkowska, A., Berbec, H., Semczuk, A., Cybulski, M., Sialic acid concentration in serum and tissue of endometrial cancer patients, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 76, 211–215, **1998**.
- [20] Crook, M., Haq, M., Haq, S., Tutt, P., Plasma sialic acid and acute phase proteins in patients with myocardial infarction, *Angiology*, 45, 709–715, **1994**.
- [21] Crook, M.A., Couchman, S., Tutt, P., Plasma fibrinogen and its relationship to plasma sialic acid in non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 7, 586–589, **1996**.
- [22] Dogan, H., Pasaoglu, H., Ekinciler, O.F., Tatlisin, N., A comparative study of total protein, total and lipid associated serum sialic acid levels in patients with Behcet's disease and control groups, *Acta Ophthalmologica*, 70, 790–794, **1992**.
- [23] Sillanaukee, P., Ponnio, M., Seppa, K., Sialic acid–new potential marker of alcohol abuse, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23, 1039–1043, **1999**.
- [24] Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P., Shaw, L., Biochemistry and role of sialic acids, Rosenberg, A., Eds. *Biology of the sialic acids*, New York: Plenum Publishing Corp., **1995**.
- [25] Fan, X., She, Y.M., Bagshaw, R.D., Callahan, J.W., Schachter, H., Mahuran, D.J., A method for proteomic identification of membrane-bound proteins containing Asn-linked oligosaccharides, *Analytical Biochemistry*, 332, 178-186, **2004**.
- [26] Bunkenborg, J., Pilch, B.J., Podtelejnikov, A.V., Wisniewski, J.R., Screening for N-glycosylated proteins by liquid chromatography mass spectrometry, *Proteomics*, 4, 454-465, **2004**.

- [27] Qiu, R., Regnier, F.E., Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics, *Analytical Chemistry*, 77, 2802-2809, **2005**.
- [28] Zhang, H., Li, X.J., Martin, D.B., Aebersold, R., Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry, *Nature Biotechnology*, 21, 660-666, **2003**.
- [29] Liu, T., Qian, W.J., Gritsenko, M.A., Camp, D.G., Monroe, M.E., Moore, R.J., Smith, R.D., Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry, *Journal of Proteome Research*, 4, 2070-2080, **2005**.
- [30] Zhang, H., Yi, E.C., Li, X.J., Mallick, P., Kelly-Spratt, K.S., Masselon, C.D., Camp, D.G., Smith, R.D., Kemp, C.J., Aebersold, R., High throughput quantitative analysis of serum proteins using glycopeptide capture and liquid chromatography mass spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, 144-155, **2005**.
- [31] Kaji, H., Saito, H., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Hirabayashi, J., Kasai, K., Takahashi, N., Isobe, T., Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins, *Nature Biotechnology*, 21, 667-672, **2003**.
- [32] Morelle, W., Donadio, S., Ronin, C., Michalski, J.C., Characterization of N-glycans of recombinant human thyrotropin using mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 331-345, **2006**.
- [33] Hirabayashi, J., Lectin-based structural glycomics: Glycoproteomics and glycan profiling, *Glycoconjugate Journal*, 21, 35-40, **2004**.
- [34] Cummings, R.D., Kornfeld, S., Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-Agarose affinity chromatography. A rapid, sensitive, and specific technique, *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 11235-12240, **1982**.
- [35] Wang, L., Li, F., Sun, W., Wu, S., Wang, X., Zhang, L., Zheng, D., Wang, J., Gao, Y., Concanavalin A-captured glycoproteins in healthy human urine, *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 560-562, **2006**.
- [36] Uematsu, R., Furukawa, J., Nakagawa, H., Shinohara, Y., Deguchi, K., Monde, K., Nishimura, S., High throughput quantitative glycomics and glycoform-focused proteomics of murine dermis and epidermis, *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, 1977-1989, **2005**.
- [37] Yang, Z., Hancock, W.S., Monitoring glycosylation pattern changes of glycoproteins using multi-lectin affinity chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1070, 57-64, **2005**.
- [38] Wang, Y., Wu, S.L., Hancock, W.S., Approaches to the study of N-linked glycoproteins in human plasma using lectin affinity chromatography and nano-HPLC coupled to electrospray linear ion trap-fourier transform mass spectrometry (LTQ/FTMS), *Glycobiology*, 16, 514-523, **2006**.

- [39] Qiu, R., Regnier, F.E., Comparative glycoproteomics of N-linked complex-type glycoforms containing sialic acid in human serum, *Analytical Chemistry*, 77, 7225-7231, **2005**.
- [40] Alvarez-Manilla, G., Atwood J. 3rd, Guo, Y., Warren, N.L., Orlando, R., Piercei M., Tools for glycoproteomic analysis: size exclusion chromatography facilitates identification of tryptic glycopeptides with N-linked glycosylation sites, *Journal of Proteome Research*, 5, 701-708, **2006**.
- [41] Wada, Y., Tajiri, M., Yoshida, S., Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple-stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics, *Analytical Chemistry*, 76, 6560-6565, **2004**.
- [42] Takegawa, Y., Deguchi, K., Keira, T., Ito, H., Nakagawa, H., Nishimura, S.I., Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized N-glycans and N-glycopeptides of human serum immunoglobulin-G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1113, 177-181, **2006**.
- [43] Tajiri, M., Yoshida, S., Wada, Y., Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment, *Glycobiology*, 15, 1332-1340, **2005**.
- [44] Larsen, M.R., Hojrup, P., Roepstorff, P., Characterization of gel-separated glycoproteins using two-step proteolytic digestion combined with sequential microcolumns and mass spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, 107-119, **2005**.
- [45] Adriaens, A., Van Vaeck, L. Adams, F., Static secondary ion mass spectrometry: (S-SIMIS) Part 2. Material sciences applications, *Mass Spectrometry Reviews*, 18, 48-81, **1999**.
- [46] Beckey, H.D., *Principles of Field Ionization and Field Desorption in Mass Spectrometry*, Pergamon Press, Oxford, **1977**.
- [47] McFarlane, R.D., Torgesson, T.F., Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy, *Science*, 191, 920-925, **1976**.
- [48] McNeal, C.J., McFarlane, R.D., Observation of a fully protected oligonucleotide dimer at m/z 12637 by californium-252 plasma desorption mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society*, 103, 1609-1610, **1981**.
- [49] Karas, M., Hillenkamp, F.H., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Analytical Chemistry*, 60, 2229-2301, **1988**.
- [50] Hillenkamp, F., Karas, M., Ingeldoh, A., Stahl, B., Matrix assisted UV-laser desorption ionization: a new approach to mass spectrometry of large molecules, in *Biological Mass Spectrometry*, Burlingame, A.L., McCloskey, J.A. Eds., Elsevier, Amsterdam, **1990**.

- [51] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F., Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78, 53-68, **1987**.
- [52] Stump, M.J., Fleming, R.C., Gong, W.H., Jaber, A.J., Jones, J.J., Surber, C.W., Wilkins, C.L., Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry, *Applied Spectroscopy Reviews*, 37, 275-303, **2002**.
- [53] Chen, X.J., Carroll, J.A., Beavis, R.C., Near-UV-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9, 885-891, **1998**.
- [54] Knochenmuss, R., A quantitative model of UV matrix-assisted laser desorption/ionization, *Journal of Mass Spectrometry*, 37, 867-877, **2002**.
- [55] Karas, M., Kruger, R., Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism, *Chemical Reviews*, 103, 427-440, **2003**.
- [56] Dreisewerd, K., The desorption process in MALDI, *Chemical Reviews*, 103, 395-425, **2003**.
- [57] Zenobi, R., Knochenmuss, R., Ion formation in MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 17, 337-366, **1998**.
- [58] Knochenmuss, R., Zenobi, R., MALDI Ionization: In-plume processes, *Chemical Reviews*, 103, 441-452, **2003**.
- [59] Karas, M., Hillenkamp, F.H., *Ion Formation from Organic Solids IV*, Benninghoven, A., Eds., John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 103, **1988**.
- [60] Spengler, B., Cotter, R.J., Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 Daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis, *Analytical Chemistry*, 62, 793-796, **1990**.
- [61] Pasch, H., Schrepp, W., *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*, Springer Laboratory XVIII, **2003**.
- [62] Hillenkamp, F.H., Karas, M., *Methods in Enzymology*, McCloskey, J.A., Eds., Academic Press, New York, vol. 193 pp. 280-295, **1990**.
- [63] Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D.E., Caprioli, R.M., Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues, *Nature Medicine*, 7, 493-496, **2001**.
- [64] Beynon, J., The use of the mass spectrometer for the identification of organic compounds, *Microchimica Acta*, 44, 437-453, **1956**.
- [65] McLafferty, F.W., Mass spectrometry in chemical research and production, *Society for Applied Spectroscopy*, 11, 148-156, **1957**.
- [66] Gohlke, R.S., Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography, *Analytical Chemistry*, 31, 535-541, **1959**.

- [67] Munson, M.S.B., Field, F.H., Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction, *Journal of the American Chemical Society*, 88, 2621-2630, **1966**.
- [68] McLafferty, F.W., Bryce, T.A., Metastable-ion characteristics: characterization of isomeric molecules, *Chemical Communications*, 1215-1217, **1967**.
- [69] Jennings, K.R., Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 1, 227-235, **1968**.
- [70] Beckey, H.D., Field desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 2, 500-502, **1969**.
- [71] Karataev, V.I., Mamyrin, B.A., Smikk, D.V., *Sov. Phys.–Tech. Phys.*, 16, 1177, **1972**.
- [72] Cooks, R.G., Beynon, J.H., Caprioli, R.M., Lester, G.R., *Metastable Ions*, Elsevier, New York, p. 296, **1973**.
- [73] Horning, E.C., Carroll, D.I., Dzidic, I., Haegele, K.D., Horning, M.G., Stillwell, R.N., Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream, *Journal of Chromatographic Science*, 412, 725-729, **1974**.
- [74] Arpino, P.J., Baldwin, M.A., McLafferty, F.W., Liquid chromatography/mass spectrometry. II. continuous monitoring, *Biomedical mass spectrometry*, 1, 80-82, **1974**.
- [75] Comisarov, M.B., Marshall, A.G., Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *Chemical Physics Letters*, 25, 282-283, **1974**.
- [76] Macfarlane, R.D., Torgesson, D.F., Californium-252 plasma desorption mass spectrometry, *Science*, 191, 920-925, **1976**.
- [77] Yost, R.A., Enke, C.G., Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer, *Journal of the American Chemical Society*, 100, 2274-2275, **1978**.
- [78] Houk, R.S., Fassel, V.A., Flesch, G.D., Inductively coupled argon plasma as an ion-source for mass-spectrometric determination of trace-elements, *Analytical Chemistry*, 52, 2283-2289, **1980**.
- [79] Barber, M., Bardoli, R.S., Sedgwick, R.D., Tyler, A.H., Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7, 325-327, **1981**.
- [80] Haakansson, P., Kamensky, I., Sundqvist, B., Fohlman, J., Peterson, P., McNeal, C.J., Macfarlane, R.D., Iodine-127-plasma desorption mass spectrometry of insulin, *Journal of the American Chemical Society*, 104, 2948-2949, **1982**.

- [81] Barber, M., Bordoli, R.S., Elliott, G.J., Sedgwick, R.D., Tyler, A.N., Green, B.N., FAB-MS of Bovine insulin and other large peptides, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 936-938, **1982**.
- [82] Blakney, C.R., Vestal, M.L., Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 55, 750-754, **1983**.
- [83] Stafford, G.C., Kelley, P.E., Syka, J.E.P., Reynolds, W.E., Todd, J.F.J., Recent improvements in and analytical applications of advanced ion-trap technology, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 60, 85-89, **1984**.
- [84] Tanaka, T., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Protein and polymer analysis up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2, 151-153, **1988**.
- [85] Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R., Smith, R.D., On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 59, 1230-1232, **1987**.
- [86] Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, 246, 64-71, **1989**.
- [87] Yamashita, M., Fenn, J.B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme, *The Journal of Chemical Physics*, 80, 4451-4459, **1984**.
- [88] Dole, M., Mach, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B., Molecular beams of macroions, *The Journal of Chemical Physics*, 49, 2240-2249, **1968**.
- [89] Katta, V., Chait, B.T., Observation of the hemoglobin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society*, 113, 8534-8535, **1991**.
- [90] Ganem, B., Li, Y.T., Henion, J.D., Detection of noncovalent receptorligand complexes by mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society*, 113, 6294-6296, **1991**.
- [91] Spengler, B., Kirsch, D., Kaufmann, R., Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 5, 198-202, **1991**.
- [92] Julian, R.K. and Cooks, R.G., Broad band excitation in the quadrupole ion trap mass spectrometer using shaped pulses created using the inverse fourier transform, *Analytical Chemistry*, 65, 1827-1833, **1993**.
- [93] Wilm, M., Mann, M., *Proceedings of the 42nd ASMS Conference*, Chicago, IL, p. 770, **1994**.
- [94] Makarov, A., Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high performance technique of mass analysis, *Analytical Chemistry*, 72, 1156-1162, **2000**.

- [95] Hoffmann, E., Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Eds, Brussels, Belgium, **2007**.
- [96] Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M., Improved analysis by MALDI of matrix surfaces from fast evaporation, *Analytical Chemistry*, 66, 3281-3287, **1994**.
- [97] Xiang, F., Beavis, R.C., A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8, 199-204, **1994**.
- [98] Mann, M., Meng, C.K., Fenn, J.B., Interpreting mass spectra of multiply charged ions, *Analytical Chemistry*, 61, 1702–1708, **1989**.
- [99] Mora, J.F., van Berkel, G.J., Enke, C.G., Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 35, 939–952, **2000**.
- [100] Cech, N.B., Enke, C.G., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrometry Reviews*, 20, 362–387, **2001**.
- [101] Rohner, T.C., Lion, N., Girault, H.H., Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionization, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6, 3056–3068, **2004**.
- [102] Kebarle, P., Tang, L., From ions in solution to ions in the gas phase. The mechanism of electrospray mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 65, 972A, **1993**.
- [103] Paul, W., Steinwedel, H.S., Ein neues massenspektrometer ohne magnetfeld, *Zeitschrift für Naturforschung A*, 8, 448-450, **1953**.
- [104] Ferguson, R.E., McKulloh, K.E., Rosenstock, H.M., Observation of products of ionic collision processes and ion decomposition, *The Journal of Chemical Physics*, 42, 100-106, **1965**.
- [105] Kienitz, H., *Massenspektrometrie*, Verlag Chemie, Weinheim, **1968**.
- [106] Stephens, W., A Pulsed mass spectrometer with time dispersion, *Physical Review*, 69, 691, **1946**.
- [107] Wiley, W.C., McLaren, J.B., Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution, *Review of Scientific Instruments*, 16, 1150-1157, **1955**.
- [108] Imrie, D.C., Pentney, J.M., Cottrell, J.S., A Faraday cup detector for high-mass ions in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 9, 1293-1296, **1995**.
- [109] Moniatte, M., van der Goot, F.G., Buckley, J.T., Pattus, F., van Dorsselaer, A., Characterization of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry, *FEBS Letters*, 384, 269–272, **1996**.

- [110] Zhao, X., Ma, C., Han, H., Jiang, J., Tian, F., Wang, J., Ying, W., Qian, X., Comparison and optimization of strategies for a more profound profiling of the sialylated N-glycoproteomics in human plasma using metal oxide enrichment, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 5519-5529, 2013.
- [111] Palmisano, G., Lendal, S.E., Engholm-Keller, K., Leth-Larsen, R., Parker, B.L., Larsen, M.R., Selective enrichment of sialic acid-containing glycopeptides using titanium dioxide chromatography with analysis by HILIC and mass spectrometry, *Nature Protocols*, 5, 1974–1982, **2010**.
- [112] Larsen, M.R., Jensen, S.S., Jakobsen, L.A., Heegaard, N.H.H., Exploring the Sialome Using Titanium Dioxide Chromatography and Mass Spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 1778-1787, **2007**.
- [113] Wan, H., Yan, J., Yu, L., Sheng, S., Zhang, X., Xue, X., Li, X., Liang, X., Zirconia layer coated mesoporous silica microspheres as HILIC SPE materials for selective glycopeptide enrichment, *Analyst*, 136, 4422-4430, **2011**.
- [114] Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer Jr, T.H., Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through use of endoglycosidases, *Analytical Biochemistry*, 180, 195-204, **1989**.
- [115] Palmisano, F., Lendal, S.E., Larsen, M.R., Titanium dioxide Enrichment of sialic-acid containing glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, 753, 309-322, **2011**.
- [116] Zhu, J., Wang, F., Cheng, K., Dong, J., Sun, D., Chen, R., Wang, L., Ye, M., Zou, H., A simple integrated system for rapid analysis of sialic-acid-containing N-glycopeptides from human serum, *Proteomics*, 13, 1306-1313, **2013**.
- [117] Palmisano, G., Parker, B.L., Engholm-Keller, K., Lendal, S.E., Kulej, K., Schulz, M., Schwammle, V., Graham, M.E., Saxtorph, H., Cordwell, S., Larsen, M.R., A novel method for the simultaneous enrichment, identification, and quantification of phosphopeptides and sialylated glycopeptides applied to a temporal profile of mouse brain development, *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, 1191-1202, **2012**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Burak Tavşanlı

Doğum Yeri : Eskişehir/Odunpazarı

Medeni Hali : Bekar

E-posta : burtav05@hacettepe.edu.tr

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

Eğitim

Lise : Eskişehir Muzeffer Çil Anadolu Lisesi

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü

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

Doktora: -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce-İyi, Portekizce-İyi

İş Deneyimi

- DÖRT-A TIP MALZ. SAN. İTH. İHR. TİC. LTD. ŞTİ.
Ar-Ge Sorumlusu (Mayıs 2012 – Şubat 2014)
- İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Araştırma Görevlisi (Şubat 2014- ...)

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-