

**BÖLGEYE ÖZGÜ GLİKOLİZASYON ANALİZLERİNDE
KULLANILAN ÇARPIŞMALI FRAGMENTASYON
TEKNİKLERİNİN GLİKOPEPTİT TANIMLAMA
PERFORMANSLARININ KIYASLANMASI**

**COMPARISON OF GLYCOPEPTIDE IDENTIFICATION
PERFORMANCES OF COLLISIONAL
FRAGMENTATION TECHNIQUES USED IN SITE-
SPECIFIC GLYCOSYLATION INVESTIGATION**

SEMA BALTACI

PROF. DR. BEKİR SALİH

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

Canım ailem'e...

ÖZET

BÖLGEYE ÖZGÜ BÖLGEYE ÖZGÜ GLİKOLİZASYON ANALİZLERİNDE KULLANILAN ÇARPIŞMALI FRAGMENTASYON TEKNİKLERİNİN GLİKOPEPTİT TANIMLAMA PERFORMANSLARININ KIYASLANMASI

Sema BALTACI

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Haziran 2023, 84 sayfa

Protein glikozilasyonu, Post Translasyonel Modifikasyon (PTM) çeşitlerinden biridir ve birçok fizyolojik ve biyolojik süreçlerle ilişkilidir. Glikoprotein kimliği hakkında bilgi sahibi olmak için peptit dizisi, glikozilasyon bölgesi ve glikan yapısı hakkında bilgi üretilmelidir. Glikopeptitlerin analizi için Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS) yaygın olarak kullanılmaktadır. Peptit ve glikan yapıları farklı kimyasal özellikleri nedeniyle karmaşıktır. Parçalama yöntemlerinden biri olan Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama (CID), Dört Kutuplu-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (QTOF-MS) enstrümanı ile beraber uyumlu bir şekilde çalışmaktadır. Yüksek Enerjili C-trap İle Parçalama (HCD) yöntemi ise, Dört Kutuplu Orbitrap (Q- Exactive Plus) enstrümanı ile çalışmaktadır.

Ayrıca çok benzer olan HCD ve CID tekniği, glikan birimleri için B- ve Y- tipi fragmentleri üretirken peptit omurga parçalaması sonucunda peptit fragmentlerine ait b- ve y- tipi iyonları üretir. Son yıllarda fragment iyonların verimliliği arttırmak için Basamaklı Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama (sCID) ve Basamaklı Yüksek Enerjili C-trap İle Parçalama (sHCD) tekniği ortaya çıkmıştır. Bu tekniklerle farklı enerjiler uygulanarak hem glikan hem de peptit fragmentleri hakkında eş zamanlı bilgi edinilir.

Tez kapsamında, QTOF s(CID) (Basamaklı Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama) ve Q-Exactive Plus s(HCD) (Basamaklı Yüksek Enerjili C-trap İle Parçalama) sistemlerinin glikopeptit tanımlama performansları kıyaslanmıştır. Haptoglobin (Hpt) proteininin, Hpt 1-1, Hpt 2-2 ve Hpt-M adı verilen bu üç farklı varyantı tez çalışmasında kullanılmıştır. Her bir varyant, dört tekrarlı olacak şekilde hem QTOF s(CID) hem de Q-Exactive Plus s(HCD) sistemlerinde analiz edilmiştir. QTOF s(CID) sistemi, Q-Exactive Plus s(HCD) sistemine göre hem daha çok glikozilasyon bölgesi hem de daha fazla glikopeptit sayısı tanımlamıştır. Q-Exactive Plus s(HCD) sistemi, QTOF s(CID) sistemine göre daha yüksek toplam ortalama skor sayısı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glikopeptit, Haptoglobin (Hpt), QTOF s(CID) (Basamaklı Çarpışma İle İndüklenmiş parçalama), Q-Exactive Plus s(HCD) (Basamaklı Yüksek Enerjili C-trap İle Parçalama), Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS)

ABSTRACT

COMPARISON OF GLYCOPEPTIDE IDENTIFICATION PERFORMANCES OF COLLISIONAL FRAGMENTATION TECHNIQUES USED IN SITE-SPECIFIC GLYCOSYLATION INVESTIGATION

Sema BALTACI

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALIH

June 2023, 88 pages

Glycosylation is one of the most important post translational modifications of proteins and is involved in all kinds of biological and physiological processes. In order to have information about the identity of the glycoprotein, information about the peptide sequence, glycosylation site, and glycan structure must be generated. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) is widely used for the analysis of glycopeptides. Collision-Induced Dissociation (CID), one of the fragmentation methods, works in harmony with the Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry (QTOF-MS) instrument.

Higher-Energy C-trap Dissociation (HCD) method works with the Quadrupole Orbitrap (Q-Exactive Plus) instrument. Also, the very similar technique of HCD and CID, generate primarily b- and y-ions from peptide precursor ions, as well as B- and Y-ions from glycans units. In recent years, to increase the efficiency of fragment ions Stepped Collision Induced Dissociation (sCID) and Stepped Higher-energy C-trap Dissociation (sHCD) techniques have emerged. With these techniques, different energies are applied to obtain simultaneous information about both glycan and peptide fragments.

Within the scope of the thesis, glycopeptide identification performances of QTOF s(CID) (Stepped Collision Induced Dissociation) and Q-Exactive Plus s(HCD) (Stepped Higher-energy C-trap Dissociation) systems were compared. These three different variants of haptoglobin (Hpt) protein called Hpt 1-1, Hpt 2-2 and Hpt-M were used in the thesis study. Each variant was analyzed in both QTOF s(CID) and Q-Exactive Plus s(HCD) systems in four replicates. The QTOF s(CID) system defined both more glycosylation sites and more glycopeptide numbers than the Q-Exactive Plus s(HCD) system. The Q-Exactive Plus s(HCD) system has a higher total average score than the QTOF s(CID) system.

Keywords: Glycopeptide, Haptoglobin (Hpt), QTOF s(CID) (Stepped Collision Induced Dissociation), Q-Exactive Plus s(HCD) (Stepped Higher-energy C-trap Dissociation), Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, pek çok kişi tarafından desteklenen çabalarının bir sonucudur. İlk ve en derin takdirim laboratuvarının bir parçası olma fırsatı verdiği, tüm deneyimlerini benimle paylaşarak bana bilimin en iyi sihir türü olduğunu gösterdiği, her koşulda bana sonsuz güveni ve sonsuz sabrı için akıl hocam, değerli danışmanım Prof. Dr. Bekir SALİH'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımında aklımda soru işareti kaldığı zaman istediğim gibi sorduğum, engin bilgilerini bana aşıladığı ve hem samimi hem destekleyici yaklaşımı için değerli hocam Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI'ya teşekkür ederim.

Kararlarım konusunda beni her zaman iyi hissettiren, bilgilerine ve çevresindeki insanları iyi hissettirme yeteneklerine hayranlık duyduğum, ne zaman bir problem yaşasam o zaman yanımda olan çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Atakay ve Dr. Ülkü Güler'e beni her koşulda destekledikleri için teşekkür ederim. SAREG grubunun üyelerine beni her zaman pozitif karşıladığı, yardımları ve cesaretlendirmeleri için teşekkür etmek istiyorum.

Her zaman okulda günlerimi mükemmelleştirdikleri ve bu süre boyunca benimle ilgilenen kıymetli arkadaşlarım; Ege Tını Tunca, Buse Varlıoğlu, Erol Tunca'a ve bu süreçte olumlu düşünceleriyle beni her zaman sakinleştirdiği, güzel düşünceleriyle hayatıma ışık tuttuğu için Alperen Kıratlı'ya çok teşekkür ederim.

Son olarak yıllar boyunca desteğini hiç esirgemeyen anne ve babama teşekkür ederim. Benim için yaptıkları fedakarlıkların karşılığını asla ödeyemem. Tezimdeki yardımları ve sonsuz desteği nedeniyle motivasyon kaynağım biricik kardeşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kütle Spektrometrisi (MS)	3
2.2. İyonlaştırma Yöntemleri	4
2.2.1. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)	6
2.3. Kütle Ayırıcıları	8
2.3.1. Dört Kutuplu Kütle Spektrometrisi (Quadrupole-MS).....	8
2.3.2. Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (TOF-MS)....	10
2.3.3. Dört Kutuplu-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (QTOF-MS)	12
2.3.4. Orbitrap Kütle Spektrometrisi.....	14
2.4. Post Translasyonel Modifikasyonlar (PTM).....	17
2.5. Protein Glikozilasyonu.....	18
2.5.1. N-Glikanların Yapısı.....	19
2.6. Glikoproteomiks ve Glikomiks.....	20
2.7. Kütle Spektrometrisi İle Glikopeptitlerin Analizi.....	21
2.8. Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS)....	21
2.8.1. Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama (CID).....	23
2.8.2. Elektron Çarpışma İle Parçalama (ECD).....	26
2.8.3. Elektron Transfer Parçalama (ETD).....	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	27
3.1. Kimyasal Malzemeler	27

3.2. Haptogloblin Varyantlarının Çözeltide Proteolitik Parçalanması.....	27
3.3. N-glikopeptitlerin nLC-C18-ESI-sCID-MS/MS Analizleri.....	27
3.4. N-glikopeptitlerin nLC-C18-ESI-sHCD-MS/MS Analizleri.....	28
3.5. Glikopeptitlerin Belirlenmesi ve Veri Analizleri.....	29
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	30
4.1. Hpt 1-1 Varyantının QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) Sistemleri Kullanılarak Skor Analizleri	30
4.2. Hpt 2-2 Varyantının QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) Sistemleri Kullanılarak Skor Analizleri.....	32
4.3. Hpt-M Varyantının QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) Sistemleri Kullanılarak Skor Analizleri.....	34
4.4. Ortalama Kütle Hatası.....	35
4.5. Toplam Ortalama Skor Sayısı.....	37
4.6. Tespit Edilen Glikozilasyon Bölgesi Sayısı ve Tespit Edilen N-Glikopeptit Sayısı.....	38
4.7. Tespit Edilen Glikozilasyon Bölgelerinin İncelenmesi.....	40
4.8. Glikopeptit Yapısında Fukoz Birimi İçerme Durumuna Bağlı Olarak Skor Sayılarının İncelenmesi.....	41
4.9. Glikopeptit Yapısında Siyalik Asit Birimi İçerme Durumuna Bağlı Olarak Skor Sayılarının İncelenmesi.....	42
4.10. Öncül İyonların Yüküne Bağlı Olarak Skor Sayılarının İncelenmesi.....	43
5. YORUM.....	46
6. KAYNAKLAR.....	48
EKLER	58
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	58
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kütle spektrometresini meydana getiren temel bölümlerin gösterimi.....	4
Şekil 2.2. ESI yönteminin gösterimi.....	7
Şekil 2.3. Bir dört kutuplu kütle ayırıcısının gösterimi.....	9
Şekil 2.4. (A) Lineer tipi uçuş zamanlı ve (B) refletron tipi uçuş zamanlı kütle spektrometrelerinin şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.5. Bir dört kutuplu-uçuş zamanlı (Q-TOF) kütle ayırıcısının gösterimi.....	13
Şekil 2.6. Orbitrap sisteminin gösterimi.....	15
Şekil 2.7. Bir Q-Exactive analiz cihazının kapsamlı gösterimi.....	16
Şekil 2.8. Yaygın olan Post Translasyonel Modifikasyonlarının gösterimi.....	18
Şekil 2.9. N- ve O-bağlı glikozilasyon birimlerinin gösterimi.....	19
Şekil 2.10. N-glikan yapısının üç temel kategorisi olan yüksek mannoz, kompleks ve hibrit şeklinde sınıflandırılmasının gösterimi.....	20
Şekil 2.11. Tandem kütle spektrometresi kullanılarak bir analizinin şeması.....	22
Şekil 2.12. MS/MS'de iki farklı parçalama yollarının gösterimi.....	23
Şekil 2.13. Parçalama sonucu oluşan glikan birimlerine ait B- ve Y- tipi iyonların gösterimi.....	24
Şekil 2.14. Parçalama sonucu oluşan peptid fragment iyonların adlandırılması.....	25
Şekil 4.1. Haptoglobin proteinin, β zincirindeki bölgeye özgü glikozilasyon haritasının şematik gösterimi [1].....	30
Şekil 4.2. Hpt 1-1 varyantının Asn 241 glikozilasyon bölgesine sahip +4 yüklü iyonlarının A) Orbitrap s(HCD) analiz cihazından ve B) QTOF s(CID) analiz cihazından elde edilen MS/MS spektrumları.....	31
Şekil 4.3. Hpt 2-2 varyantının Asn 207 glikozilasyon bölgesine sahip +2 yüklü iyonlarının A) Orbitrap s(HCD) analiz cihazından ve B) QTOF s(CID) analiz cihazından elde edilen MS/MS spektrumları.....	33

Şekil 4.4. Hpt-M varyantının Asn 184 glikozilasyon bölgesine sahip +3 yüklü iyonlarının A) Orbitrap s(HCD) analiz cihazından ve B) QTOF s(CID) analiz cihazından elde edilen MS/MS spektrumları.....	34
Şekil 4.5. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazları kullanılarak elde edilen MS/MS kütle hatası (ppm) verilerinin kıyaslanması.....	36
Şekil 4.6. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazları kullanılarak elde edilen toplam ortalama skor sayılarının kıyaslanması.....	37
Şekil 4.7. Belirlenen N-glikozilasyon sayısının, Orbitrap s(HCD) ve B) QTOF s(CID) cihazlarında kıyaslanması.....	38
Şekil 4.8. Belirlenen N-glikopeptit sayısının, Orbitrap s(HCD) ve B) QTOF s(CID) cihazlarında kıyaslanması.....	39
Şekil 4.9. Orbitrap s(HCD) ve B) QTOF s(CID) cihazlarında tüm glikozilasyon bölgelerinin skor ortalamaları analizlerinin kıyaslanması.....	40
Şekil 4.10. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazlarında glikopeptitlerin yapılarında fukoz bulundurma durumuna göre yapılan analizlerin kıyaslanması.....	41
Şekil 4.11. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazlarında glikopeptitlerin yapılarında siyalik asit bulundurma durumuna göre yapılan analizlerin kıyaslanması.....	42
Şekil 4.12. Farklı yük dağılımlarının ortalama skor sayıları üzerine A) Orbitrap s(HCD) ve B) QTOF s(CID) cihazlarında kıyaslanması.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Da	dalton
eV	elektrovolt
Hz	hertz
kV	kilovolt
MHz	megahertz
µg	mikrogram
µm	mikrometre
mM	milimolar
ng	nanogram
v	volt

Kısaltmalar

ABC	Amonyum bikarbonat
Asn	Asparajin
CID	Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama
DTT	Ditiotreitol
ECD	Elektron İle Parçalama
ESI	Elektrosprey İyonizasyonu
ETD	Elektron Transfer Parçalaması
FTICR	Fourier Dönüşümlü İyon Siklotron Rezonans
Fuc	Fukoz

Gal	Galaktoz
GalNAc	N-asetil galaktozamin
Glu	Glikoz
GlyNAc	N-asetil glikozamin
HCD	Yüksek Enerjili C-trap İle Parçalama
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
HPT	Haptoglobin
IAA	Iyodoasetamit
LC	Sıvı Kromatografisi
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma
Man	Mannoz
MS	Kütle Spektrometrisi
MS/MS	Tandem Kütle Spektrometrisi
NeuNAc	N-asetil nöraminik asit
PTM	Post Translasyonel Modifikasyonlar
QqQ	Üçlü Dört Kutuplu
Q-TOF	Dört Kutuplu-Uçuş Zamanlı
s(CID)	Basamaklı Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama
s(HCD)	Bacamaklı Yüksek Enerjili C-trap İle Parçalama
Ser	Serin
TFA	Trifloroasetik asit
Thr	Threonin
TOF	Uçuş Zamanlı

1. GİRİŞ

Glikozilasyon, proteinler ve lipidler üzerinde karmaşık glikan yapılarının kovalent bağlanması işlemidir. Protein glikozilasyonu, protein fonksiyonunu düzenleyen çok çeşitli biyolojik süreçlerde yer alır. Glikoprotein, kısaca yapısında peptit ve glikan bulunduran yapılardır. Glikoprotein yapısını tam anlamak için hem peptit hem de glikan yapısı iyi tanımlanmalıdır. Glikanların karmaşıklığı ve heterojenliği nedeniyle, glikozile edilmiş proteinlerin analizi oldukça zordur. Glikanlar, proteinlerin katlanması, hücre sinyali, bağışıklık fonksiyonu gibi çok sayıda önemli role sahiptir. Glikanları oluşturan monosakkaritler, hidroksil grubundan anomerik karbona giden oksijenin ilişkisine bağlı olarak α bağları veya β bağları olabilen glikosidik bağlar yoluyla bağlanır.

Glikoproteinlerin MS analizi, glikozile edilmiş proteini tanımlamak, glikozilasyon bölgesini belirlemek ve glikan yapılarını karakterize etmek için stratejiler geliştirme etrafında döner. Peptitlerdeki amino asit dizisini, glikan kısmındaki dizisi ve glikozilasyon bölgesini belirlemek için tandem MS gerçekleştirilmelidir. Tek aşamada uygulanan MS, sonuçları bir glikopeptidin yalnızca m/z'sini sağladığından, ayrıntılı yapısal bilgilerin elde edilebileceği öncül iyonu izole etmek ve parçalamak için tandem MS analizi gereklidir. Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama (CID) tekniği, çok yaygın olarak kullanılan Tandem Kütle Spektrometresi tekniğidir. Burada iyonlar hızlandırılarak etkinleştirilir ve ardından helyum, nitrojen veya argon gibi bir çarpışma gazıyla çarpışmasına izin verilir. Bu teknik uygulandığında yapıdaki en zayıf bağların kırılmasına yol açar. CID uygulanan glikopeptitlerde genellikle glikozidik bağ kırılır dolayısıyla spektrumda glikan kısmıyla ilgili parçalama ürünleri görülmüş olur ve bölgeye özgü glikozilasyon analizlerinde uygun olmayan bir tekniktir. Hem peptitlerin hem de glikanların CID tarafından parçalanması çoğunlukla glikanlar için B- ve Y- tipi peptitler için b- ve y- tipi iyonları üretir. QTOF s(CID) sisteminde ve Q-Exactive Plus s(HCD) sisteminde kullanılan farklı enerjiler uygulanarak hem glikan hem de peptit fragmentleri hakkında eş zamanlı olarak bilgi edinilir.

Tez kapsamında, QTOF s(CID) (Basamaklı arpışma İle İndüklenmiş Parçalama) ve Q-Exactive Plus s(HCD) (Bacamaklı Yüksek Enerjili C-trap İle Parçalama) sistemlerinin glikopeptit tanımlama performansları kıyaslanmıştır. Haptoglobin (Hpt) proteininin, Hpt 1-1, Hpt 2-2 ve Hpt-M adı verilen bu üç farklı varyantı tez çalışmasında kullanılmıştır. Her bir varyant, dört tekrarlı olacak şekilde hem QTOF s(CID) hem de Q-Exactive Plus s(HCD) sistemlerinde analiz edilmiştir.

Asp 184, Asn 207, Asn 211 ve Asn 241'de bulunan Hpt'nin beta zincirinde dört N-glikozilasyon bölgesi tanımlanmıştır. QTOF s(CID) sistemi, Q-Exactive Plus s(HCD) sistemine göre hem daha çok glikozilasyon bölgesi hem de daha fazla glikopeptit sayısı tanımlamıştır. Q-Exactive Plus s(HCD) sistemi, QTOF s(CID) sistemine göre daha yüksek toplam ortalama skor sayısı tespit edilmiştir. Skor parametresi, spektrumda oluşan parçalama iyonları ile orantılıdır. Hem peptit hem de glikan fragment iyonları oluşumu ne kadar çok olmuşsa skor sayısı o kadar iyi gelmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (MS)

20. yüzyılın başlarında kütle spektrometresi, atomik ve moleküler yapının temel yönlerini araştırmak, elementlerin atomik ağırlıklarının bulunması ve kararlı izotopların belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Kütle spektrometresinin temeli, Joseph John Thomson'un bir katot ışını tüpünün içindeki bir elektrik alanı kullanarak elektronu keşfetmesine dayanır. Joseph John Thomson, bu amaçla ilk kütle spektrometresini yapmış ve 1906'da Nobel Fizik Ödülü'nü almıştır [2]. Daha sonrasında Francis William Aston, 1913 de, neon atomunun ^{20}Ne ve ^{22}Ne olan iki izotopunu belirlemiştir. Bu gelişme, kimyasal elementlerin izotopik halinin keşfidir. Aston çalışmalarına Ar, Hg, Cl gibi birçok elementin izotopik bileşimiyle alakalı veriler eklemiştir. Thomson ve asistanı Francis William Aston'ın kütle spektrometresi kullanarak birçok farklı elementin izotoplarının keşfedilmesini sağlayan çalışmaları 1922 yılında Kimya Nobel Ödülü ile taçlandırılmıştır [3].

Kütle spektrometrisi (Mass Spectrometry, MS), moleküllerin yapısal ve kimyasal özelliklerinin analiz edilmesinin yanı sıra analit miktarlarının belirlenmesi için kullanılan önemli bir analitik tekniktir. Yüksek duyarlılığı, seçiciliği ve analiz hızı gibi önemli özellikleri sayesinde birçok uygulama alanında başarılı bir şekilde kullanılır. Kimya, yaşam bilimleri, elektronik, gıda işleme, petrol ve ilaç endüstrileri, kütle spektrometrisinin etkin bir şekilde kullanıldığı uygulama alanlarına örnek olarak verilebilir. Ayrıca çevresel kirlenmelerin tespit edilmesi ve adli kimya uygulamaları gibi oldukça düşük miktardaki türlerin analiz edildiği alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır [4][5].

Tez kapsamında çalışılmış olan glikoproteomik analizlerde, glikoproteinin enzimatik olarak parçalanmasıyla elde edilen glikopeptitlerin karakterize edilmesi ve glikozilasyon bölgelerinin belirlenmesinde de kütle spektrometrisinin oldukça düşük miktardaki örnekler için yüksek hassasiyet ve doğruluk değerlerinde veri sağlaması avantajlarından faydalanılmıştır [6].

Bir kütle spektrometresi, örnek girişi, iyonlaştırma kaynağı, kütle ayırıcısı, dedektör ve veri sistemi bileşenlerinden meydana gelir. Kütle spektrometresinde ilk olarak çalışılan analitler gaz fazında iyonlara dönüştürülmelidir. Örnekler uygun bir şekilde kütle spektrometresine iletdikten sonra, iyonlaştırma kaynağı bölümünde gaz fazı iyonları oluşturulur. Ardından gaz fazında üretilen iyonlar, kütle/yük oranlarına (m/z) göre birbirinden ayrılmalıdır. Oluşturulan her bir iyonun m/z değeri ayrı ayrı belirlenir ve bu değerler, iyonların gaz fazındaki bağıl bolluklarına karşılık gelecek şekilde ilişkilendirilerek sinyale dönüştürülür. Bu sayede, x-ekseninde kütle/yük oranı ve y-ekseninde bağıl iyon bolluğu değerlerini ifade eden kütle spektrumu oluşturulur. Kütle spektrometresinin bileşenlerinden iyonlaştırma kaynağı, kütle ayırıcıları ve dedektörler yüksek vakum altında tutulmaktadır. Analiz edilen türün gaz fazında diğer iyonlarla etkileşimlerinin en aza indirilmesi amacıyla yüksek vakum kullanılır.



Şekil 2.1. Kütle spektrometresini meydana getiren temel bölümlerin gösterimi.

2.2 İyonlaştırma Yöntemleri

Analitlerin gaz fazında iyonlara dönüştürülmesi, kütle spektrometrik analiz için öncelikli olarak gereklidir. İlk kütle spektrometresi tasarımlarında en yaygın kullanılan iyonlaştırma kaynakları, elektron iyonlaştırma (EI) ve kimyasal iyonlaştırma (CI) olmuştur [7][8]. Analitlerin önce buharlaştırılıp sonra iyonlaştırıldığı EI tekniğinde, analiz edilen moleküllerin az da olsa uçucu olmaları gerekmektedir. Bu teknik, yüksek molekül ağırlığına sahip, uçucu olmayan proteinler gibi makromoleküllerin analizleri için uygun değildir. Zaman ilerledikçe büyük, termal olarak kararsız maddelerin gaz fazı iyonu oluşturan yeni iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmiştir.

1980'lerin sonlarına doğru elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ve matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI) teknikleri, yumuşak iyonlaştırma yöntemleri olarak kullanılmaya başlanmıştır [9]. Yumuşak iyonlaştırma yöntemleri, kısa zaman içerisinde

çok yaygın hale gelmiştir. Bu tekniklerle gerçekleştirilen iyonlaştırma işlemlerinde analit türlerine enerji aktarılmaz ve çoğunlukla moleküler yapılarında hiçbir parçalanma meydana gelmez. Bu iki yumuşak iyonlaştırma kaynağı, biyomakromoleküllerin analizinde oldukça yaygın olarak kullanılır. MALDI yöntemi, genellikle peptitler ve proteinler, sentetik polimerler gibi yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin analizi için kullanılır [10][11].

Analit iyonlarının sürekli bir şekilde oluşturulduğu ESI tekniğinden farklı olan MALDI'de iyonlar ilk olarak lazer ışınlanması ile oluşturulur. MALDI tekniğinde iyonlaştırma sırasında analit moleküllerinin yanında matriks olarak adlandırılan, gönderilen lazerin dalga boyunda absorbandsı olan küçük organik moleküller bulundurulur. Analiz edilen örnekle uyumlu çözücülerde çözünebilir uygun matriks türlerinin seçilmesi oldukça önemlidir. Matriks, aynı zamanda vakumda kararlı olmalı ve lazer ile iletilen enerjiyi soğurmalıdır. MALDI-MS analizleri için örnek hazırlama işlemlerinin başlangıcında numune ve matriks türleri belirli çözücüler içerisinde ayrı ayrı çözülür. Matriks-numune çözeltileri belli oranlarda karıştırılır. Hazırlanan matriks-numune karışımı kuruması ve mikrokristaller oluşturması için mikrolitreden daha düşük hacimlerde çelik bir plaka üzerine damlatılır. Kurutma işlemi sonrasında oluşan kristalleri gördükten sonra plaka, cihaza gönderilebilir. Analiz sırasında numuneyi desorbe ve iyonize etmek için numune-matriks karışımlarının buldukları bölgelere lazer gönderilir [12].

MALDI işlemi sonucunda genellikle $[M+H]^+$ tek yüklü iyonlar, MALDI-MS'de oldukça düşük miktarda örnek kullanılır ve genellikle femtomol altı ($< 1 \times 10^{-15}$ mol) miktarlarda örneklerin analiz edilmesi mümkündür [13].

ESI kaynağında analit iyonları sürekli akış halinde üretilirken MALDI tekniğinde iyonlar lazer enerjisi ile atımlı (pulsed) olarak oluşturulur. ESI tekniğinde çok yüklü iyonların oluşum olasılığı daha yüksek iken, MALDI işlemi ile yapılan analizlerde tek yüklü iyonların oluşumu baskın durumdadır. MALDI-MS genelde ESI-MS'e göre daha basit örneklerin analizinde kullanılır ve bunda ESI-MS sistemlerinin sıvı bazlı ayırma teknikleriyle uyumlu olması etkilidir. MALDI'nin ESI'ye göre sağladığı en önemli avantaj ise tamponlar ve tuzlar gibi istenmeyen kirletici maddelere karşı toleransının daha yüksek olmasıdır [13]. MALDI kaynağı atımlı iyon oluşumu sağladığından dolayı, uçuş zamanlı (Time-of-Flight, TOF) kütle ayırıcısı ile beraber oldukça uyumlu çalışır. Bu sayede, MALDI-TOF-MS sistemleri ile yüksek kütle çözünürlüklü, yüksek kütle doğruluğunda

ve geniş kütle analiz aralığında analizlerin yapılması mümkündür. MALDI tekniğinde bir dezavantaj olarak matriks bileşikleri de analiz sırasında iyonlaştırılabilir bu da kütle spektrumunda matrikse ait sinyallerin gözlenmesine neden olur. Bu nedenle, MALDI-MS analizlerinde düşük m/z bölgesinde (m/z 800 altı) matriks iyonlarına ait sinyallerin baskın olarak gözlenmesi, küçük moleküllerin analizlerinde dezavantajlı bir duruma neden olabilmektedir.

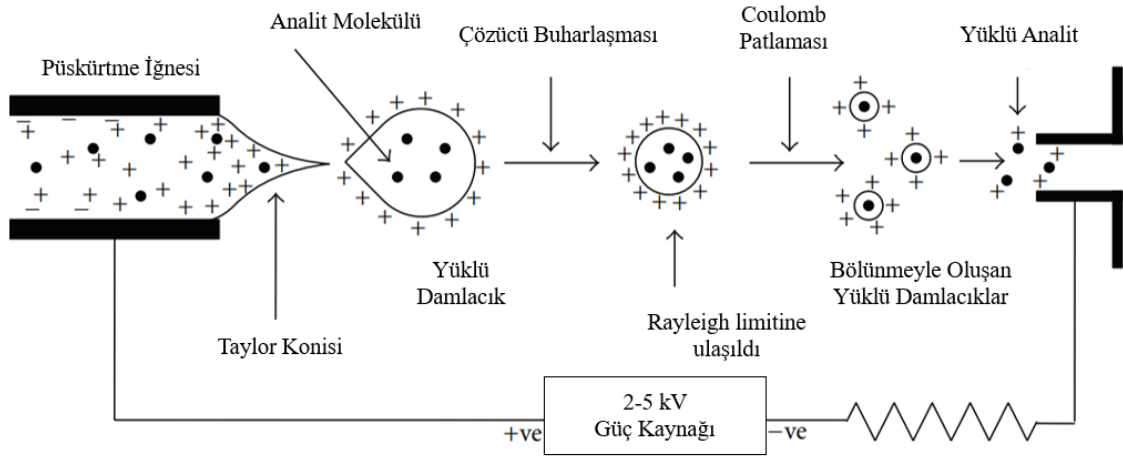
2.2.1. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)

Bir diğer yumuşak iyonlaştırma kaynağı olan elektrosprey iyonlaştırma (ESI), çözeltideki analitleri buharlaştırmak ve gaz fazı moleküllerini iyonize etmek için kullanılan bir tekniktir. ESI ile iyonlaştırılan analit moleküllerinin orta seviyede polar olmaları, iyonlaştırma verimliliği açısından avantaj sağlar. ESI, çoğunlukla birden fazla yüke sahip iyonlar oluşturur ve bu sayede büyük moleküller için birçok kütle spektrometrik sistem ile uygun m/z değerlerinde sinyaller elde edilebilmesi mümkündür [14]. ESI-MS, karmaşık yapılardan lipitler ve oligonükleotitler, polimerler ve proteinler gibi farklı makromoleküllerin analiz edilmesinde kullanılır [15][16][17].

Bu teknik, yüklü damlacıkların üretimi, yüklü damlacıkların parçalanması ve son olarak iyonların üretimi adımlarından oluşur. İlk olarak, su, asetonitril gibi polar bir çözücü içinde çözülmüş numune, güçlü bir elektrik alanı oluşturan bir karşı elektrot ile yüksek potansiyel farkına sahip olan bir kılcal iğneden fışkırtılır. İğne ucu genellikle $\pm 2-5$ kV ile yüklenir. Uygulanılan potansiyel değeri pozitif veya negatif iyon oluşturma durumuna göre değişebilir. Pozitif iyonların analizinde iğnenin ucuna pozitif bir yük uygulanırken, negatif iyonları analiz edebilmek için iğne negatif olarak yüklenmektedir [14]. Çözünmüş numune, yüklenmiş kılcal iğneden akarken, sıvı yüzeyinde yük birikintisi oluşur ve kılcalın ucunda Taylor konisi adı verilen ve daha sonra küçük damlacıkların oluştuğu bir yapı meydana gelir [18].

Ayrıca aynı zamanda iğne ucuna azot gazı akışı uygulanır ve böylece gaz akışının damlacık ile çarpışması, çözücünün buharlaşmasına neden olur. Oluşan yüklü damlacıklar kütle ayırıcısına doğru giderken buharlaşmaya uğrayarak küçülürler ve damlacıkların boyutu küçüldükçe, yüzeylerindeki yük yoğunluğu artar. Rayleigh limiti, yüzey gerilimlerinin yük yoğunluğunun üstesinden geldiği noktadır. Büyük damlacıklar, Coulomb patlaması adı verilen bir proseste, küçülen damlacıkların yüzey gerilimi artık

Rayleigh limitindeki artan itme yüküne katlanamadığında daha küçük damlacıklar oluşturmak üzere parçalanır ve bu döngü sürekli olarak tekrarlanır. Bu işlem sonucunda $[M+nH]^{n+}$ iyonları oluşturulmuş olur.



Şekil 2.2. ESI yönteminin gösterimi [14].

ESI’da iyonların oluşumuna ile ilgili olarak iki zıt mekanizma önerilmektedir. Bunlardan biri, yük kalıntı modelidir. Bu modelde çözücü küçük damlacıklardan buharlaştıkça yük, analit molekülüne geçmeye başlar ve analit iyonu üretilir. Bu modelin büyük ve çok yüklü iyonların, özellikle proteinlerin iyonlaşmasını en iyi şekilde tanımladığı düşünülmektedir. İyon buharlaşma modelinde ise küçük damlacıkta bulunan elektrik alanının, iyonların damlacık yüzeyinden dışarı atılmasına neden olmak için yeterli olduğu ve bunun 20 nm ölçeğinden daha düşük damlacık çapında meydana geldiği belirtilmektedir. Bu modelin düşük molekül ağırlıklı yapıların analizi için daha uygun olduğu ifade edilebilir [19].

ESI-MS analizlerinin hassasiyeti, numune çözeltisinde sodyum klorür gibi bazı tuzların varlığında ciddi ölçüde düşebilir. Analiz edilen örnek içerisinde bazı metal iyon tuzlarının düşük derişimlerde bulunması bile, iyonlara spesifik olmayan metal iyonlarının eklenmesine bağlı olarak kütle spektrumlarında analitlere ait sinyallerin bastırılmasına ve pik genişlemelerine neden olabilir. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için çoğu biyolojik örneğin ESI-MS analizinden önce tuzdan arındırılması gerekmektedir. ESI

kaynağında analitler, sürekli akan bir çözültiden gaz fazına aktarıldığından dolayı, ESI-MS sistemlerindeki kütle spektrometrelerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi ayırma teknikleri ile birleştirilmesiyle oldukça karmaşık numunelerin analizi mümkün hale getirilebilmektedir.

2.3. Kütle Ayırıcıları

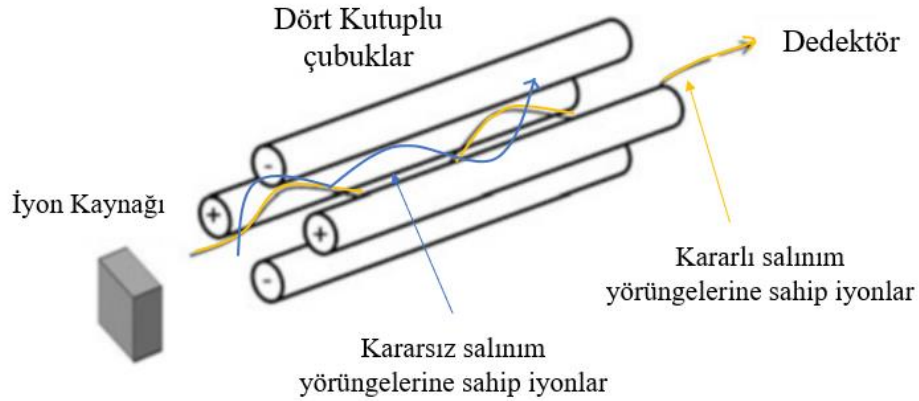
İyon kaynağında üretilen iyonlar, kütle spektrometresine cihazına aktarılır ve elektriksel veya manyetik etkileşimler aracılığıyla kütle/yük oranlarına göre analizleri gerçekleştirilir. Kütle spektrometrik analizlerde farklı avantaj ve dezavantajlara sahip birçok kütle ayırıcısı kullanılmaktadır. Kütle ayırıcılarının verimli bir şekilde sonuç elde edilebilmesi için yüksek kütle çözünürlüğü ve kütle doğruluğu sağlamaları beklenmektedir. Bu iki parametre birbiriyle oldukça ilişkilidir ve yüksek kütle çözünürlüğü yüksek kütle doğruluğunda verilerin elde edilmesini sağlar. Ayrıca kütle ayırıcılar, iyon sinyalinin numune derişimiyle orantılı olduğu aralık olarak bilinen dinamik aralık ve tandem MS (MS/MS) çalışmalarını gerçekleştirebilme yetenekleri bakımından da farklılık gösterir. Kütle ayırıcılar, farklı m/z değerlerini belirleme işlemlerinin yanında iyonları yakalama ve depolama yeteneğine de sahiptir. Dört kutuplu (Quadrupole), iyon tuzağı (Ion Trap), uçuş zamanlı ve fourier dönüşüm ayırıcıları (iyon siklotron [ICR] ve Orbitrap) yaygın olarak kullanılmakta olan kütle ayırıcılardır. Bunların yanı sıra, yapılan çalışmalarda farklı kütle ayırıcılarının birleştirilmesiyle meydana getirilen çok sayıda yeni tür kütle ayırıcısı da kullanılmaktadır [20]

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda Orbitrap ve uçuş zamanlı (TOF) kütle ayırıcılarının verimliliği kıyaslanmıştır.

2.3.1. Dört Kutuplu Kütle Spektrometrisi (Quadrupole-MS)

Bir dört kutuplu kütle ayırıcısı, biri pozitif diğeri negatif yükte iki çift paralel silindir şeklindeki çubuktan oluşur ve aynı yüke sahip çubuklar çapraz bir şekilde konumlandırılmıştır. Hem doğru akım (DC) hem de radyo frekansı (RF) potansiyelleri, dört kutuplunun zıt çubuk çiftlerine uygulanır. Çubuklara uygulanan RF ve DC potansiyelinin birleşimi belirli bir frekansa ayarlanır ve o frekansa uyan m/z oranındaki iyonlar, tespit edilmek üzere çubuk boyunca bir yolu takip eder. Ayarlanan frekansa sahip

olmayan iyonlar ise, kararsız bir yörünge takip eder ve yükü nötrleştiren bir elektron olarak dört kutuplu çubukların çeperleriyle çarpışır, dedektöre ulaşamayıp analiz edilemez [21][22].



Şekil 2.3. Bir dört kutuplu kütle ayırıcısının gösterimi [21].

Dört kutuplu ayırıcılar, yalnızca RF potansiyeli kullanılarak tüm iyonların kutuplar arasında geçmesini ve bu sayede iyonların kütle spektrometresinin bir bölümünden diğerine iletilmesini sağlayan bir iletim aracı görevi görür. Yalnızca RF potansiyeli kullanıldığında dört kutuplu ayırıcılar, bir iyon parçalama yöntemi olan çarpışma ile indüklenmiş parçalamanın (collision-induced dissociation, CID) gerçekleştirildiği çarpışma hücreleri olarak da görev alabilir [23].

Dört kutuplu ayırıcıların düşük maliyetli olmaları, küçük boyutlu olmaları, sağlamlıkları ve bakım kolaylıkları gibi özellikleri onları avantajlı hale getirir. Ayrıca dört kutuplu ayırıcılar sürekli bir iyon akışına ihtiyaç duyduklarından, hem gaz kromatografisi (GC) hem de sıvı kromatografisi (LC) cihazlarına kolayca bağlanabilir [24].

Dört kutuplu kütle ayırıcısının m/z aralığı, ilgilenilen analitin yapısına bağlı olarak 300 ile 4000 değerleri arasında değişebilmektedir. Erişilen yüksek teknoloji sayesinde, bu tür kütle ayırıcıları kullanılarak yüksek kütle doğruluğunda veriler elde edilebilmektedir. Kütle çözünürlüğü de uygulanan RF ve DC potansiyellerinin oranına bağlı olarak değişir. Tüm kütle spektrometrik analizlerde olduğu gibi, yüksek kütle çözünürlüğü değerlerinde veri almaya çalışılırken hassasiyetin azaldığı gözlenir. Bundan dolayı, dört kutuplu kütle

ayırıcıları ile yüksek m/z değerlerine sahip iyonların analizleri gerçekleştirilirken hassasiyette düşüş meydana gelebilir [13].

Özellikle MS/MS analizlerinde karşılaşılan düşük kütle çözünürlüğü ve kütle doğruluğu gibi dezavantajlı durumların en aza indirilebilmesi için yaygın olarak üçlü dört kutuplu (triple quadrupole) olarak veya uçuş zamanlı kütle ayırıcısı ile birlikte kullanımı (Q-TOF) tercih edilmektedir.

2.3.2. Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (TOF-MS)

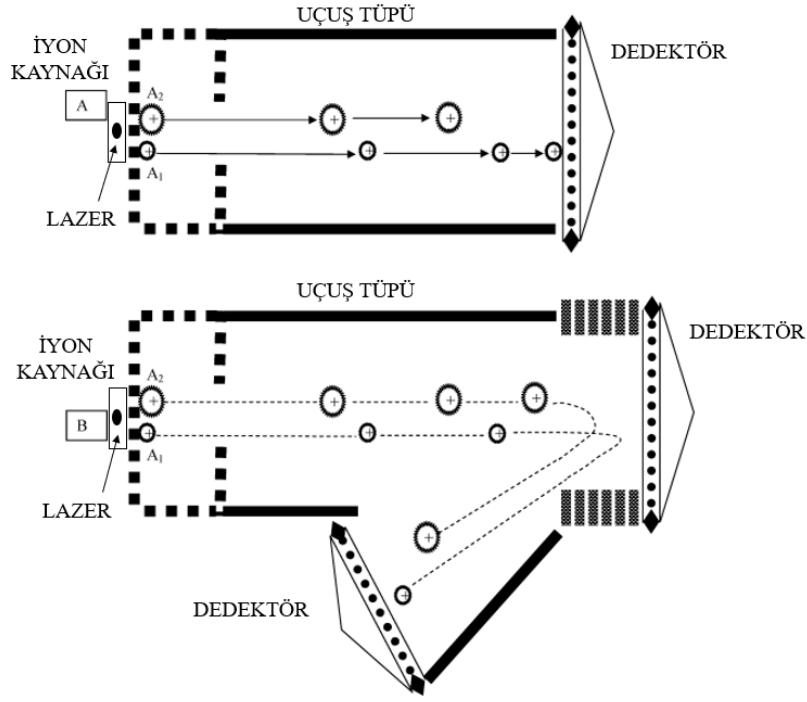
Uçuş zamanlı (TOF) analiz cihazlarının temeli, iyonların 1-2 metre uzunluğundaki bir tüp içinde geçirdiği süre ve iyonların o tüp içindeki hızlarına bağlı olarak ayrılmaları temeline dayanmaktadır. Çalışma prensibi, momentum korunum ilkesine bağlıdır. İyon kaynağında oluşan tüm iyonlara belli bir potansiyel uygulanır ve TOF analiz tüpünde iyonlar, yaklaşık 20-30 kV aralığında bir elektrik alan kuvvetiyle hızlandırılır. Oluşan aynı yüklü iyonların aynı kinetik enerji değerine de sahip olmalarından dolayı, iyonların hızı $\sqrt{m/z}$ değeri ile doğru orantılı olacaktır. Düşük m/z oranına sahip iyonlar, dedektöre yüksek m/z oranına sahip iyonlardan daha hızlı ulaşır yani daha hızlı hareket eder. Uçuş tüpünde ayrılan iyonlar, farklı zamanlarda dedektöre ulaşır ve kütle spektrumunda farklı sinyaller verirler [25].

Bu kütle ayırıcısının kullanıldığı uygulamalarda daha başarılı sonuçlar alınabilmesi için çeşitli iyileştirmeler yapılabilmektedir. Kütle çözünürlüğünün yükseltilmesi için uçuş tüpünün uzunluğunu arttırılması bu iyileştirmelere örnek olarak verilebilir. Daha kısa uçuş mesafesine sahip lineer tip TOF cihazlarında tüm iyonların aynı hıza sahip olarak uçuşürmeleri oldukça önemlidir. Başlangıçta iyonları hızlandırmak için uygulanan enerji aynı olamadığından, aynı yüke sahip olan tüm iyonların hızları farklı değerlerde olabilmektedir. Bu durum, düşük kütle ayırıcılığında verilerin elde edilmesine neden olabilmektedir. Söz konusu problemi ortadan kaldırarak kütle çözünürlüğünün iyileştirilmesi için TOF tekniğinde gecikmeli salım (delayed extraction) adı verilen ve iyonların birkaç yüz nanosaniye gibi kısa bir bekletilme olayından sonra hızlandırılmasına dayanan bir çözüm yöntemi uygulanmaktadır. Böylece hızlandırmadan önce iyonların düzgün bir ortalama momentuma sahip olması sağlanır [25][26].

İyonların ilerlediği TOF tüpü içerisine ek olarak, refletron adı verilen bir elektrostatik ayna yerleştirilir. İyonlar onları döndüren ve ikinci bir uçuş yolculuğundan dedektöre

gönderen bir elektrostatik aynaya girerler. Bu tipte iyonların uçuş yolu uzar, daha uzun yol kat ederler. Böylece, yüksek kinetik enerjiye sahip olan iyonlar, refletron sistemine daha fazla nüfuz eder ve sonuç olarak daha hızlı iyonların refletron tarafından daha fazla alıkonmasıyla iyonlar arasındaki kinetik enerji farkı en aza indirilebilir [27]. Refletron işlemi ile benzer m/z değerine sahip iyonların hızları arasındaki küçük farklılıklar belirlenebilmektedir. Bu sayede refletron, TOF kütle spektrometrisinin kütle çözünürlüğünü artırır ve daha doğru kütle ölçümlerinin gerçekleştirilmesini sağlar. Bir TOF kütle ayırıcısının, dört kutuplu ve iyon tuzaklı kütle ayırıcılara göre en büyük avantajı, büyük m/z değerine sahip iyonların yüksek kütle çözünürlüğü ve kütle doğruluğu ile belirlenebilmesini sağlamasıdır [28]. Ayrıca TOF kütle ayırıcılarının sağladığı yüksek tarama hızları sayesinde geniş bir kütle aralığında analiz yapılabilmesi mümkün hale gelmektedir. TOF, iyonları paketler halinde analiz eden bir kütle ayırıcısıdır. Bu teknik özellikle MALDI kaynağı ile birlikte kullanılmaktadır. MALDI-TOF-MS, DNA, enzimler, proteinler, oligosakkaritler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip biyomoleküllerin oldukça düşük derişimlerde analiz edilmesini sağlayan hassas bir tekniktir [29][30]. TOF kütle ayırıcısının sürekli akış halinde iyon sağlayan iyon kaynakları ile uyumluluğu düşüktür. ESI gibi sürekli iyon kaynağıyla beraber kullanılacaksa ortogonal yönlendirme ile uyumlu halde çalışabilir. Yani uçuş tüpü, ESI kaynağına ve iyon ışınına 90 derecelik açı ile konumlandırılır.

Uçuş zamanlı kütle ayırıcısının, ortogonal yönlendirme ile dört kutuplu kütle ayırıcısı ile birleştirilmesi sonucunda meydana getirilen dört kutuplu-uçuş zamanlı (Q-ToF) kütle spektrometreleri günümüzde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sayede, sürekli akış temeliyle çalışan LC/MS sistemleri ile TOF kütle ayırıcıları entegre hale getirilebilmektedir [31].



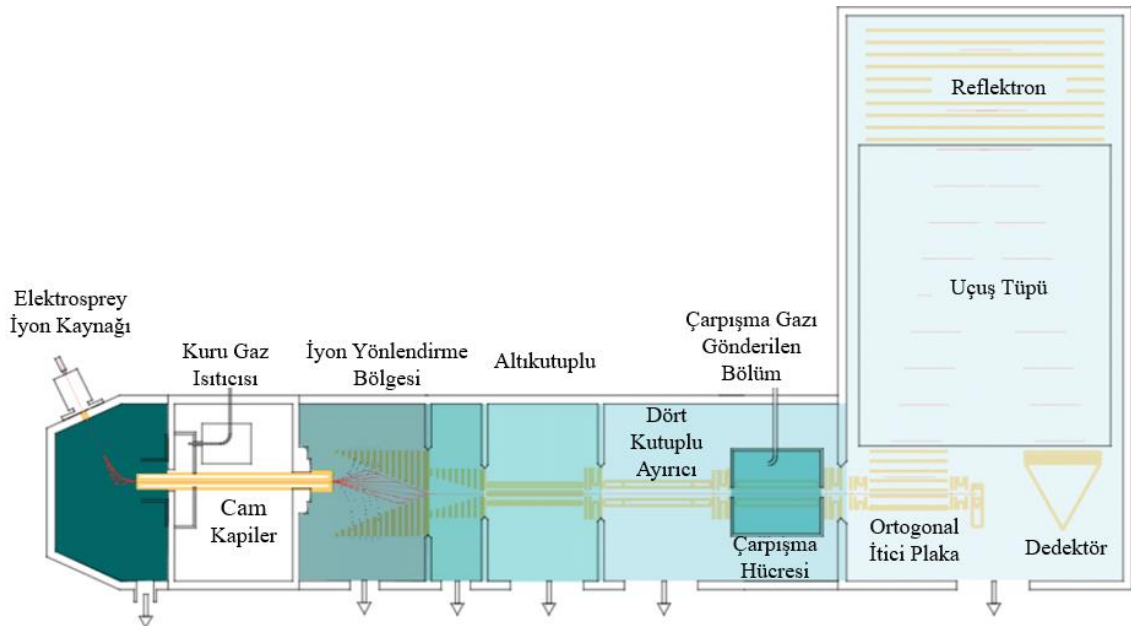
Şekil 2.4. (A) Lineer tipi uçuş zamanlı ve (B) reflektör tipi uçuş zamanlı kütle spektrometrelerinin şematik gösterimi [32].

2.3.3. Dört Kutuplu-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (Q-TOF-MS)

Dört kutuplu-uçuş zamanlı (Q-TOF) kütle ayırıcısı, iki farklı tekniğin birleşmesiyle elde edilen hibrit bir analitik sistemdir. Adından da anlaşılacağı üzere dört kutuplu ve uçuş zamanlı kütle ayırıcılarının birleşiminden oluşur. Dört kutuplu kütle ayırıcısının basit kullanımına TOF'un yüksek hassasiyeti ve yüksek kütle doğruluğunun eklenmesiyle etkili bir sistem oluşturulmuştur. Q-TOF-MS, üç temel teknolojiye dayanır: Dört kutuplu ayırıcı (Q1), bir çarpışma bölümü (q2) ve reflektör tipi uçuş zamanlı ayırıcıdan meydana gelir. Ayrıca iki ayırıcının birlikte çalışabilmesi için TOF ayırıcısı, dört kutuplu kütle ayırıcısından gelen iyon yönüne ortogonal bir geometriyle konumlandırılır. Bu kütle spektrometresinde dört kutuplu kütle ayırıcısı, iki farklı şekilde kullanılabilir. Q-TOF-MS tekniği kullanılarak yapılan tek aşamalı MS analizlerinde, sadece RF modunda birinci (Q1) ve ikinci (Q2) dört kutuplu kütle ayırıcıları kullanılır. İlk basamak olan Q1, TOF analiz cihazına gönderilmek üzere belirlenen iyonun kütlesi veya kütle aralığını seçmek için de kullanılabilir. MS/MS analizlerinde ise iyonların çarpışma ile indüklenmiş parçalama (CID) yönteminin meydana geldiği çarpışma hücrelerine iletilmeleri için Q1 yalnızca RF modunda kullanılabilir. Çarpışma bölümünde argon, azot gibi inert gazlar

kullanılır. İyonların bu gazlarla çarpıştırılması prensibine dayanan CID tekniğiyle parçalanmaları ve daha küçük iyon birimlerinin oluşması sağlanır. Temelde iyonlaştırma kaynağında oluşturulan iyonlar, önce dört kutuplu kütle ayırıcısına girerler. Burada belirli RF ve DC voltajları uygulanır ve sadece belirli m/z değerine sahip olan iyonlar bir sonraki aşamaya geçebilir. Seçilen kararlı iyonlar, çarpışma bölgesinde parçalandıktan sonra TOF kütle ayırıcısına ulaşır [27][33]. Q-TOF-MS sistemi ile genel olarak, saniyede yaklaşık 20 kütle spektrumu verecek şekilde tek aşamalı MS veya MS/MS modunda analizler yapılmaktadır. Bu ölçekte yapılan veri kaydı, numunenin hızlı bir şekilde tayin edilmesi anlamına gelir. Ek olarak, bu hibrit sistemlerde (Q-TOF-MS) 40.000 m/z değerine kadar geniş kütle aralığı sağlanabilirken iyon kaynağında üretilen iyonların büyük çoğunluğunun dedektöre taşınabilmesi iyon kaybını azaltır [34].

Q-TOF-MS cihazında ilk basamakta TOF yerine dört kutuplu kütle ayırıcısının kullanılması, ESI ve atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) gibi tekniklerin uyumlu kullanımını sağlar. İki kütle ayırıcısının birbirine entegre edilmesi, meydana getirilen Q-TOF-MS cihazının tandem kütle analizi (MS/MS) kapasitesini de büyük ölçüde artırır [35]. Özellikle glikoproteinlerdeki glikozilasyon bölgelerinin yerlerinin tespit edilmesi çalışmalarında (bölgeye özgü glikozilasyon analizi) Q-TOF-MS cihazları yaygın olarak kullanılmaktadır.

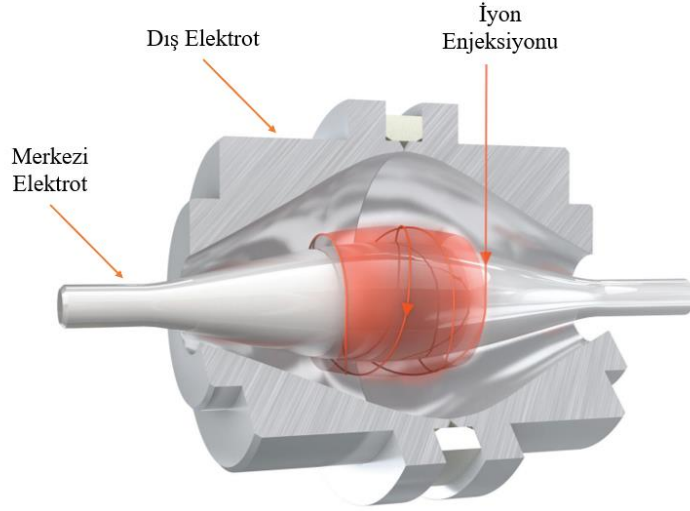


Şekil 2.5. Bir dört kutuplu-uçuş zamanlı (Q-TOF) kütle ayırıcısının gösterimi [36].

Tez kapsamında çalışılan bölgeye özgü glikozilasyon analizi, oldukça karmaşık bir biyoanalitik yöntem uygulamasıdır. Nwosu ve çalışma arkadaşları, bölgeye özgü N-glikozilasyon ve O-glikozilasyon analizleri yaptıkları çalışmalarında sığır laktoferrin, kappa kazein ve sığır fetüsünden oluşan bir glikoprotein karışımını nano-akışlı sıvı kromatografisi ile entegre olan Q-TOF-MS sistemi kullanarak analiz etmişlerdir (nano-LC/Q-TOF-MS). Bu çalışmada analiz edilen karışımda toplam 233 adet glikopeptit belirlenmiştir. Ayrıca forovin laktoferrin Asn 300 glikozilasyon bölgesi bu çalışmada ilk kez tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada Q-TOF-MS analizlerinin yüksek kütle doğruluğu ve kütle ayırıcılığında gerçekleştirilmesi sayesinde glikopeptitler üzerindeki glikozilasyon bölgeleri, detaylı bir şekilde belirlenebilmiştir [37].

2.3.4. Orbitrap Kütle Spektrometrisi

Orbitrap kütle ayırıcısı, mil benzeri bir elektrot, onu saran iki tane içi boş dış içbükey elektrot ve iyonların enjeksiyonu sürecini ayarlayan saptırma elektrodundan oluşur. Merkezi iç elektroda aşamalı bir şekilde yüksek voltaj gönderilir. İç elektroda doğru olan elektrostatik çekim, iyonların teğetsel hızından kaynaklanan bir merkezkaç kuvveti ile dengelenir. Bu elektrostatik alan, kapana sıkışmış iyonların elektrot boyunca sarmal yörünge hareketlerini sergilemesini sağlar. Dış elektrotlar ayrıca iyonların ileri ve geri aksenal harmonik hareketini algılayan alıcı plakalar olarak işlev görür. Salınan iyonlardan elde edilen sinyaller bir fourier dönüşüm tekniği kullanılarak frekans spektrumuna dönüştürülür ve kaydedilen frekanslara göre m/z oranlarının tespit edilmesini sağlar [38][39].



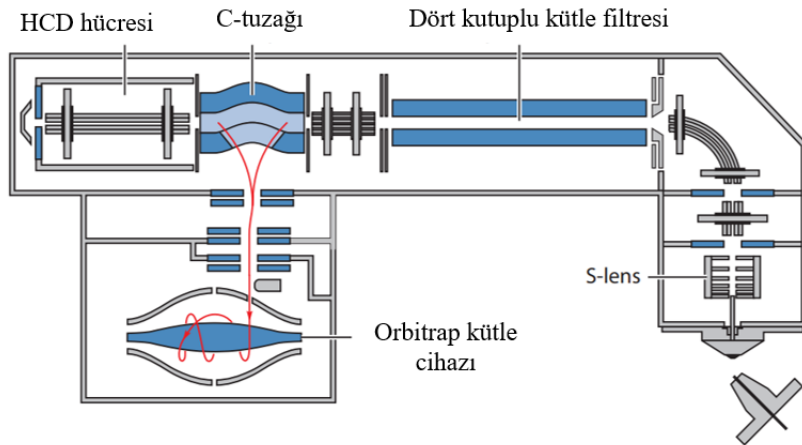
Şekil 2.6. Orbitrap sisteminin gösterimi [39].

Orbitrap cihazı, birçok uygulamada sağladığı yüksek kütle ayırıcılığı gücü sayesinde, Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans (FT-ICR) cihazları ile kıyaslanabilmektedir. Ayrıca genellikle daha yüksek m/z değerlerinde FT-ICR kütle çözünürlüğünden daha iyi kütle çözünürlük gücüne sahiptir [20]. Orbitrap kütle spektrometreleri ile 0.1-7.0 MHz (megahertz) gibi bir frekans ve m/z oranı 1-4000 aralığında analiz yapılabilmektedir [40]. Bu teknolojinin FT-ICR sistemlerine kıyasla daha basit olması, daha geniş çapta uygulamalarda kullanılabilmesi, düşük maliyetli olması, yüksek kütle çözünürlüğü ve doğruluğu sağlaması gibi avantajlarından dolayı, günümüzde farklı kütle ayırıcılarla orbitrap'ın kombine edildiği oldukça güçlü analitik sistemler kullanılmaktadır.

Tez çalışmalarında yapılan kütle spektrometrik analizlerin bir kısmında Q-Exactive Plus Orbitrap (Dört kutuplu-Orbitrap) kütle spektrometresi kullanılmıştır.

Q-Exactive Plus Orbitrap kütle spektrometresinde temel olarak; iyonlar oluşturulduktan sonra dört kutuplu kütle filtresine yönlendiren iyon transfer sistemi, C-tuzağı, HCD (yüksek enerjili c-trap ile parçalama) bölgesi ve hem tek aşamalı MS hem de tandem MS (MS/MS) analizlerinin yapılmasını sağlayan Orbitrap birimleri bulunmaktadır. Sistem içerisinde ayrıca yardımcı olarak kullanılan S-lens ve flatapole birimleri, iyon grubunu odaklar ve iyonların cihazın diğer bölümlerine transfer edilmesine yardımcı olur. Orbitrap kütle spektrometresinin ESI bölümünde, çözelti halindeki numune molekülleri gaz fazındaki iyonlara dönüştürülür. İyonlar, flatapole kısmında odaklanır ve devamında eksene eğimli olarak yerleştirilen flatapole kısmından iyonlar dört kutuplu kütle

ayırıcısına dik bir şekilde yönlendirilirler. Nötral bileşikler, kavisli geometriye giremez, böylece analiz edilemez. Dört kutuplu kütle ayırıcısına ulaşan iyonlar hızlı bir şekilde filtrelendirir. Burada çubuklara uygulanan elektrik alan bir sonraki basamak olan C-tuzağına hangi iyonların gönderileceğini belirler. C-tuzağı iyonları biriktiren ve ardından onları analiz için ayrı ayrı paketleyen yakalama hücresidir İyon kaybını en aza indiren C-tuzağı yüksek hızla işlemini tamamlar ve iyon paketlerini biriktirerek, diğer kütle ayırıcılara gönderir. Böylece Orbitrap birimini ESI gibi sürekli iyon akışıyla birlikte kullanılabilir hale getirir. Tayin için iyonlar Orbitrap'e gönderilir ya da yüksek enerjili c-trap ile parçalama (HCD) bölmesine iletilirler. Burada iyonlar, azot gazlarıyla çarpışarak daha küçük parçalanma birimlerine ayrışır. Oradan toplanan iyonlar, tekrar C-tuzağına geldikten sonra en son olarak Orbitrap kütle ayırıcısında analiz edilirler [41][42][43].



Şekil 2.7. Bir Q-Exactive analiz cihazının kapsamlı gösterimi.

Orbitrap kütle ayırıcısını içeren, LTQ-Orbitrap Velos ve Q-Exactive sistemleri, yaygın olarak proteomik alanında kullanılmakta olan kütle spektrometreleridir [41].

Lee ve arkadaşları, LTQ Orbitrap Elites (Thermo Scientific), Q-TOF (Agilent) ve Q Exactive Plus (Thermo Scientific) cihazlarını kullanarak alfa-1-asit glikoproteininin N-glikoprotein analizini gerçekleştirmiştir. Söz konusu çalışmada çarpışma ile indüklenmiş parçalama (CID) ve yüksek enerjili c-trap ile parçalama (HCD) teknikleri kullanılarak glikana ait oksonyum iyonlarını, glikopeptit fragment iyonlarını (B/Y) ve peptit fragment iyonlarını (b/y) gösteren MS/MS spektrumları elde edilmiştir. Çalışma sonucunda tespit

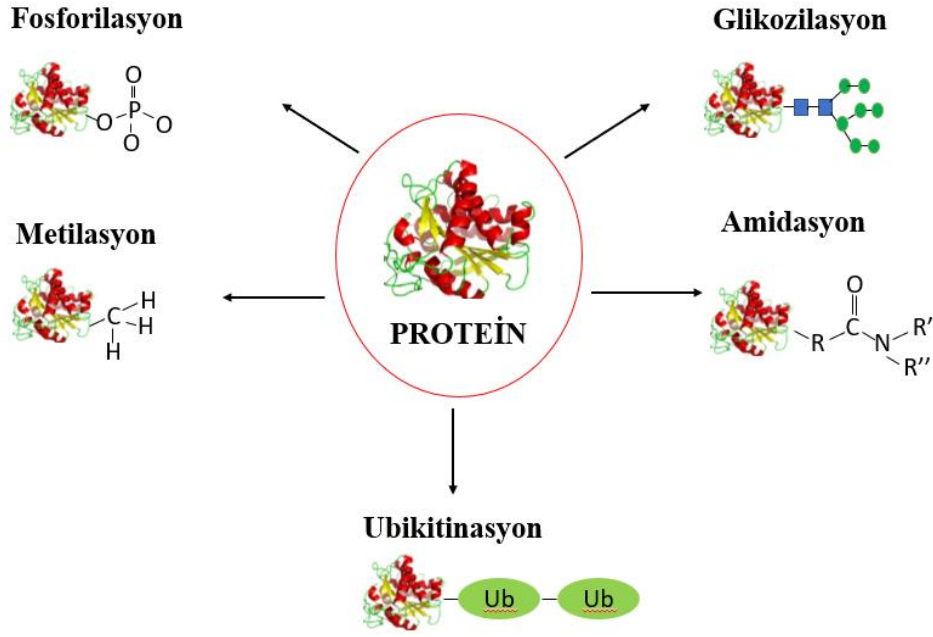
edilen N-glikopeptit sayısının azalan sırayla LTQ Orbitrap Elites (Thermo Scientific), Q-TOF (Agilent) ve Q Exactive Plus (Thermo Scientific) cihazları ile yapılan MS/MS analizleri ile belirlendiği ifade edilmiştir [44].

2.4. Post Translasyonel Modifikasyonlar (PTM)

Genomdaki proteinler ‘‘proteom’’u oluşturur. İnsan genomu 20.000-25.000 arasında gen içerirken, proteom bir milyon proteini geçer [45]. Biyolojik sistemde proteinin yapısının iyi anlaşılması oldukça önemlidir. Proteinlerin bazen işlevsel hale gelmesi için değiştirilmesi gerekir. Proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonu; hücre büyümesi, gelişme ve hayatta kalma gibi birçok biyolojik süreç için gereklidir. Proteinlerin modifikasyonu, onun hidrofobiklik, konformasyonel özellikleri gibi önemli ölçüde proteini etkileyen özelliklerini değiştirebilir. PTM'leri tanımlamak biyolojik sistemin anlaşılmasında ve hastalıkların sebep olduğu moleküler bozuklukların tespit edilmesi için oldukça önemlidir. Protein aktivitesini birçok yönünü etkileyen 400'den fazla farklı PTM türü vardır [45][46].

PTM'ye uğradıktan sonra proteinler, amino asit dizilerinin belli kısmını çıkararak ya da bir veya daha fazla amino aside modifiye edici grubun kovalent olarak eklenmesi/çıkarılması aracılığıyla modifiye edilirler. PTM'ler hem ökaryotik hücreler hem de prokaryotik hücrelerde bulunur ancak PTM'nin ökaryotik hücrelerde daha yaygın olduğu tahmin edilmektedir [46]. Genel olarak, bir PTM tersinir veya tersinmez olabilir. Tersinir reaksiyonlar kovalent modifikasyonlar, tersinmez olanlar ise tek yönde ilerleyen proteolitik modifikasyonları içerir [47].

Protein PTM, belirli kimyasal grupların amino asit yan zincirlerine enzimatik veya enzimatik olmayan bağlanmasından kaynaklanır. Bu enzimler (örneğin kinazlar), diğer proteinlerin veya peptitlerin veya daha küçük asetil, metil veya hidroksil grupları gibi basit kimyasal grupların eklenmesini katalize eder ve amino asitlerin kimyasal doğasını değiştirir. Ayrıca spesifik amino asit yan zincirlerinin modifikasyonlarını (örneğin, glutamin kalıntılarının deamidasyonu) ve bir peptit bağının bölünmesini (yani proteoliz) içerirler [48].



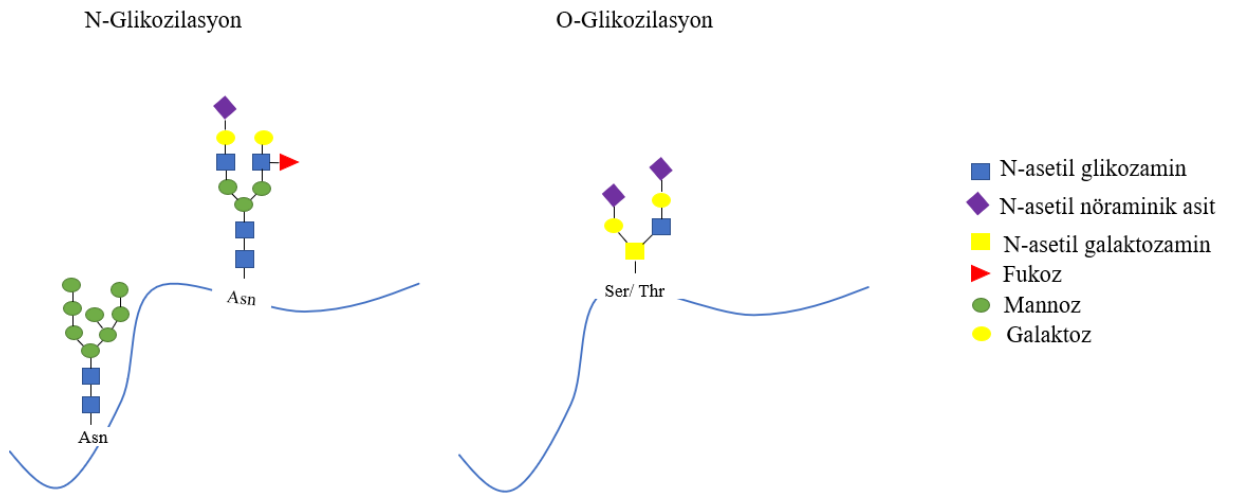
Şekil 2.8. Yaygın olan Post Translasyonel Modifikasyonların gösterimi.

2.5. Protein Glikozilasyonu

Protein glikozilasyonu, post translasyonel modifikasyonun yaygın biçimlerinden biridir ve ökaryotik proteinlerin yarısından fazlasının glikozilasyona uğradığı düşünülmektedir [49]. Protein glikozilasyonu, oligosakarit yapılarının proteinlere kovalent olarak bağlandığı işlemi olarak tanımlanır ve bazı enzimlerin yardımıyla golgi ve endoplazmik retikulumda meydana gelir [50].

Glikoprotein, yapısında karbonhidrat bulduran proteindir ve karbonhidrat grubunu içerdiği küçük aminoasit dizilerine glikopeptit denilmektedir. Karbonhidrat gruplarının birbirine bağlanmasıyla oluşan karmaşık yapılar glikan diye adlandırılır. Ayrıca glikan yapıları, bağlandıkları proteinlere ve bağlanma yerine özgüdür. Bu nedenle proteinlerin aktivitelerini kontrol etmede önemli roller oynarlar. Bir glikoprotein yapısını anlamak için peptid dizisi, glikozilasyon bölgesi ve glikan yapısı hakkında bilgi üretilmelidir. Bir glikoproteinde, proteinlere bağlı glikanlar yedi monosakkaritten oluşur: mannoz (Man), glikoz (Glu), galaktoz (Gal), fukoz (Fuc) ve N-asetil nöraminik asit (NeuNAc), N-asetil glikozamin (GlcNAc) ve N-asetil galaktozamin (GalNAc) [51]. Çeşitli süreçler içinde glikozilasyon sırasında oluşan istenmeyen mutasyonlar oluşabilir. Bu modifikasyonların altında yatan temel nedenin anlaşılması, kanser, bağışık sistemi rahatsızlıkları gibi birçok önemli hastalığın açıklanmasına yardımcı olur ve glikozile edilmiş proteinler, yeni aşılarda

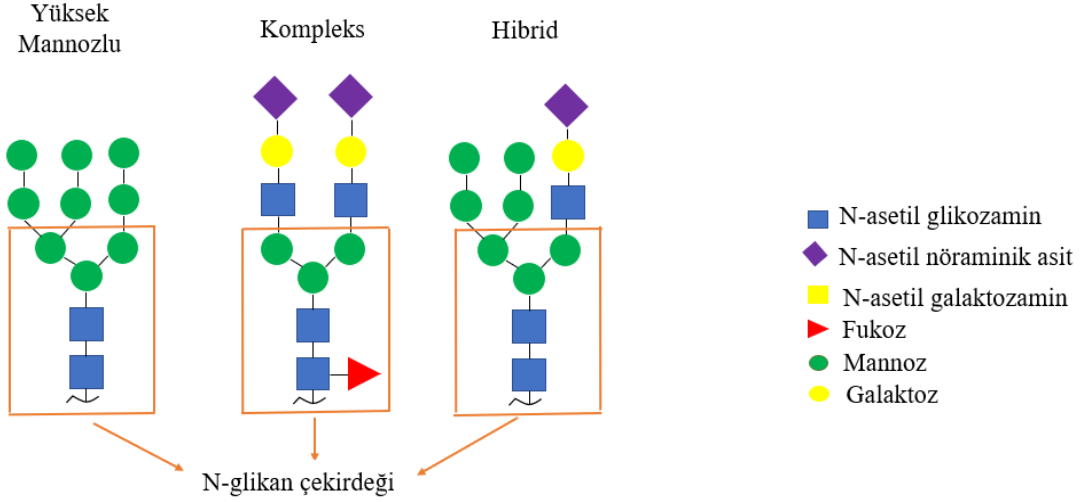
geliştirmek ve bir hastalığın erken teşhisi için yararlı biyobelirteçler olarak fayda bulmuşlardır [52][53]. Glikanlar, proteinlere genel olarak iki temel bağlantıdan biri ile bağlanır. Bunlardan biri, N-bağlı glikozilasyon olarak adlandırılır ve glikanların bir asparajin (Asn) kalıntısının yan zinciri üzerindeki amit azotuna bağlanması yoluyla gerçekleşir. Diğeri, O-bağlı glikozilasyon olarak adlandırılır ve glikanların serin (ser) ve treonin (Thr) kalıntılarının yan zincirlerindeki hidroksil gruplarına bağlanması yoluyla gerçekleşir.



Şekil 2.9. N- ve O-bağlı glikozilasyon birimlerinin gösterimi.

2.5.1. N-Glikanların Yapısı

N-glikanlar, genellikle iki N-Asetil glikoz amin (GlcNAc) ve üç mannoz kalıntısı içeren bir çekirdek yapısına sahiptir. Diziliminde “Asn-X-Thr/Ser” amino asitlerini içermektedir ama X yerine gelecek amino asidin prolin olmaması gerekmektedir. N-glikan üç sınıfa ayrılır: yüksek mannoz, kompleks ve hibrit yapılı N-glikanlardır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. N-glikan yapısının üç temel kategorisi olan yüksek mannoz, kompleks ve hibrit şeklinde sınıflandırılmasının gösterimi.

Yüksek mannozlu N-glikanlarda, çekirdeğe sadece mannoz birimleri bağlanmaktadır. Kompleks N glikanlarda, çekirdek yapısı dışında GlcNAc, galaktoz gibi çeşitli şeker birimleri katılmaktadır. Hibrit N-glikan türlerinde çekirdek yapısı dışında yapının bir kısmında yüksek mannoz yapısı, bir kısmında ise kompleks şeker birimlerinden dallanmış bölgesi bulunmaktadır [54].

2.6. Glikoproteomiks ve Glikomiks

Glikomiksler, kompleks glikanlar, glikoproteinler veya glikolipitler olarak herhangi bir yapıdaki glikanların araştırılmasını inceleyen bilim dalıdır. Yani karbonhidrat karbonhidrat, karbonhidrat-protein etkileşimleri gibi biyolojik süreçlerde karbonhidratların rolünü araştırır. Glikoproteomiks, glikozilasyona uğramış proteinlerin yapılarını inceleyen bilim dalıdır. Glikoproteomiks, glikoproteinlerin, glikozilasyon bölgelerinin tanımlanmasını ve bu glikozilasyon bölgelerinin glikan yapılarının belirlenmesini içerir ve bu durum oldukça karmaşıktır.

2.7. Kütle Spektrometrisi İle Glikopeptitlerin Analizi

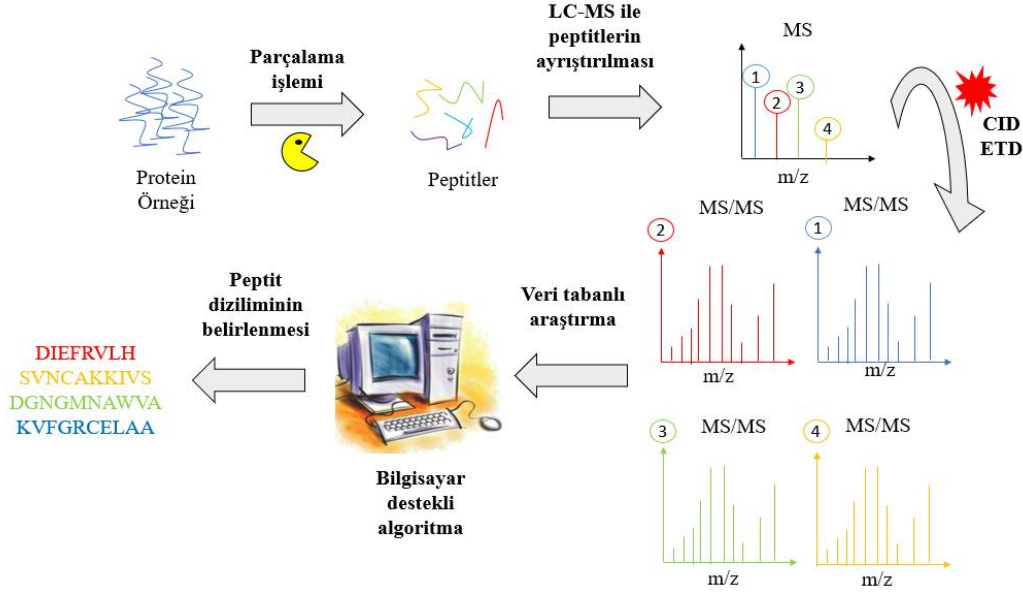
Öncelikle glikoprotein proteolizi, çeşitli enzimler kullanılarak gerçekleştirilir. Tripsin, proteini iyi tanımlanmış bölgelerde (Lys (lizin) ve Arg'nin (arjinin) C-terminal tarafından) parçalayan yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Bu sayede, proteinin amino asit dizilimi bilinirse glikopeptite ait peptit kısımları tahmin edilebilir. Bazı durumlarda büyük glikan grupları, glikozilasyon bölgesine yakın bulunan Lys ve Arg kalıntılarında tripsin parçalamasını daha da zorlaştırabilir. Ayrıca glikozile edilmemiş peptitler, çok daha zayıf iyonizasyon verimliliğine sahip olan glikopeptitlerin sinyalini baskılayabilir [55][56].

Yapıdaki glikan türleri veya glikozilasyon değişiklikleri gibi birçok molekülün detaylı incelenmesine yönelik glikoproteinleri araştırmak için birçok yaklaşım (lektin boyama, karbonhidrata özgü boyama, vb.) kullanılmıştır [56]. Ancak güçlü bir analitik teknik olan kütle spektrometrisi yüksek hassasiyeti ve verimi nedeniyle glikopeptit analizleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Glikopeptitlerin MS analizinde iki önemli yumuşak iyonizasyon yöntemleri olan ESI ve MALDI, yaygın olarak kullanılır. ESI çok yüklü glikopeptit iyonları için mükemmel bir kaynaktır çünkü büyük glikopeptitlerin m/z değerleri, yaygın olarak bulunan kütle ayırıcıları tarafından ölçülebilen aralıklara düşürülür [57][58]. MALDI, glikopeptitleri iyonize etmek için kullanılan ve tek yüklü glikopeptit iyonlarının üretildiği bir başka iyonlaştırma tekniğidir. MALDI-MS, protein biyobelirteçlerinin yüksek verimle glikozilasyon analizlerinde kullanılan bir tekniktir. Bakoviç ve arkadaşları bir MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi kullanarak insan IgG'sinin N-bağlı glikozilasyon profili analizlerini gerçekleştirdi.[59].

2.8. Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS)

Tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) tekniği adından da anlaşılacağı gibi MS işleminin iki kez tekrarlanmasıdır. İlk aşamada belli bir m/z değerinde iyonlar seçilir ve diğer oluşan iyonlardan ayrılır. Bu seçilmiş iyonlar, öncül iyonlar (precursor ions) olarak adlandırılır. Sonrasında bu öncü iyonlar, kimyasal reaksiyonların veya fiziksel etkilerin uygulanması ile daha küçük iyon birimlerine parçalanır. Parçalanma sonucunda oluşan iyonlara ürün iyonları (product ions) denir ve bunlar MS/MS analizinin ikinci aşamasında tayin edilir. Parçalama adımlarının sayısı artırılabilir ve bu analiz şekli MS_n diye

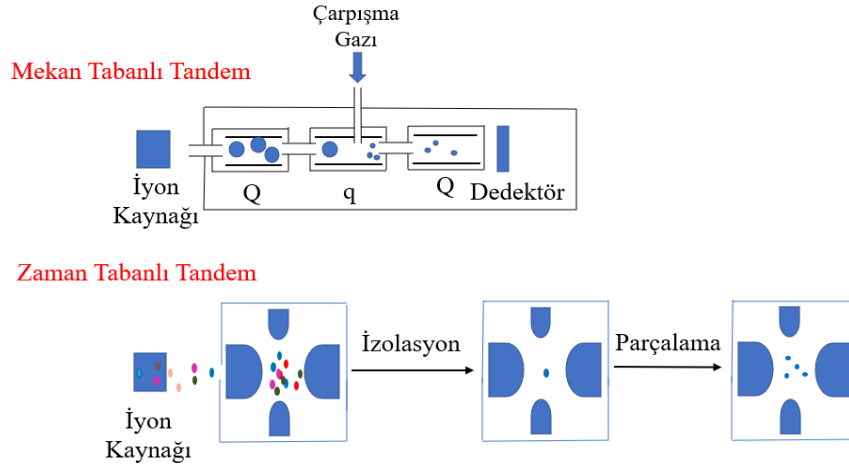
adlandırılır. MSⁿ daha çok yapısal olarak oldukça benzer bileşiklerin ayrılması için kullanılır [13].



Şekil 2.11. Tandem kütle spektrometresi kullanılarak bir analizinin şeması.

Öncül iyonun diğer iyonlardan izole edilmesini sağlayan mekan tabanlı tandem ve zaman tabanlı tandem adında iki parçalama yolu vardır. Bunlardan mekan tabanlı tandem kütle spektrometrisinde analiz, üçlü dört kutuplu (QqQ), Q-TOF gibi farklı kütle ayırıcılarını içeren hibrit sistemler tarafından gerçekleştirilir. Bu analizlerde iyonlar, ilk kütle ayırıcısına geldikten sonra parçalanacak iyon belirlenir ve sadece seçilen iyon çarpışma bölgesine iletilir. İyonlar burada nötral ve inert gaz molekülleriyle çarpıştırılarak bozulmaya uğratılır. Sonuçta parçalanma ürünleri meydana gelir ve bunlar analiz edilmesi için diğer ayırıcıya gönderilir. Zaman tabanlı tandem MS analizlerinde ise, aynı kütle ayırıcı içinde işlemler farklı zamanlarda ayrı ayrı gerçekleştirilir ve bu teknikte genellikle iyon biriktirme ilkesini taşıyan kütle ayırıcılar kullanılır. İyon tuzağı (ion trap) kütle ayırıcısı zaman tabanlı tandem MS analizlerinde tek başına veya ve hibrit olarak dört kutuplu kütle ayırıcısı ile birlikte yaygın olarak kullanılır. İlk aşamada, iyon tuzağı iyonlar ile doldurulur, öncü iyon belirlenir ve onun dışındaki iyonlar tuzaktan çıkarılır. Tuzaklanmış öncül iyon, parçalanmış ürün iyonlarını elde etmek için nötral ve inert bir gazla çarpıştırılarak parçalanır. Böylece izolasyon işleminin yapıldığı alanda çarpışma bölgesi olarak parçalama işlemi de gerçekleştirilmiş olur [60].

Tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) analizleri ile glikan yapılarının aydınlatılması, peptit/protein yapılarının amino asit dizilimlerinin ve glikozilasyon bölgelerinin belirlenmesi gibi önemli analitik veriler elde edilebilmektedir [61].



Şekil 2.12. MS/MS’de iki farklı parçalama yollarının gösterimi.

2.8.1. Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama (CID)

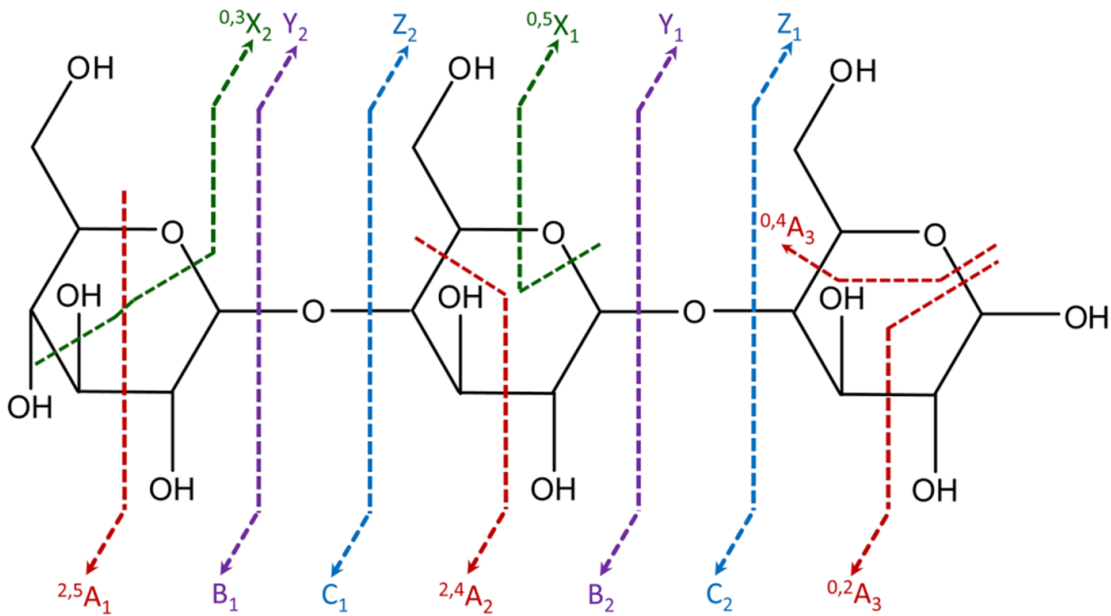
Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama (CID) tekniği, gaz fazındaki protein/peptit iyonlarını ayırmak için yaygın olarak kullanılan bir tandem MS tekniğidir. Öncül iyonlar azot, helyum gibi nötral moleküller/atomlar ile çarpıştırılarak yüksek enerjili hale getirilir. İyonlar ve gaz molekülleri/atomları arasındaki her çarpışma, iyonun kinetik enerjisinin bir kısmının iç enerjiye dönüşmesiyle sonuçlanır ve çarpışma tarafından sağlanan enerji tüm iyon içinde dağılır ve en zayıf bağın kırılmasına yol açar. Sonuç olarak da fragment iyonları elde edilmiş olur [62][63][64].

Glikopeptitin, iki monosakkarit arasındaki glikozidik bağlar için ayrışmanın enerji bariyeri peptit omurgasının amino asitlerini bağlayan amit bağlarınınkinden daha düşük olduğundan, elde edilen spektrumda daha çok B- ve Y- tipi glikan fragmentleri bulunur [64][65]. (Şekil 2.13.) ESI-tandem-MS’in CID tekniği ile birleştirilmesi yoluyla glikopeptitler üzerinde etkisi, iyon parçalanma sürecinde yer alan enerjilere, glikopeptit yapısına ve onun yük durumuna bağlıdır [66][67]. CID tekniği glikopeptitlerin analizi için iyon tuzağı, üçlü dört kutuplu, Q-TOF ve diğer hibrit sistemleri dahil olmak üzere

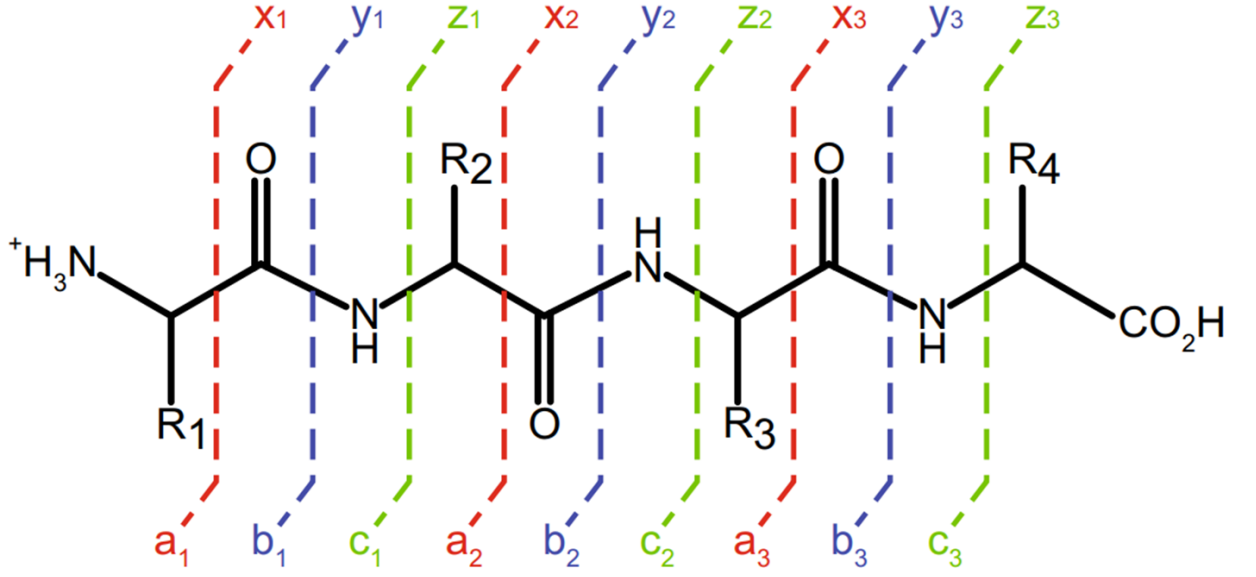
çoğu sistemde MS/MS çalışmasında kullanılır [55][68][69][70]. CID, enerji rejimine göre ikiye ayrılır: Düşük Enerjili Çarpışma İle İndüklenmiş Parçalama ve Yüksek Enerjili C-trap İle Parçalama (HCD).

Düşük enerjili-çarpışma ile indüklenmiş parçalamada, iyonlara uygulanan çarpışma enerjisi genellikle 100eV'nin altındadır. İyon ile nötr molekül/atom her çarpıştığında iyonun iç enerjisine yalnızca az bir miktar enerji eklenir ve parçalanmanın meydana gelebilmesi için yüzlerce çarpışmadan gelen enerjinin toplanması gerekir. Bu çoklu çarpışma yapıdaki en kararsız bağların parçalanmasına sebep olur ve sıklıkla peptitler/proteinler için su, amonyak gibi yapısal olarak bilgi vermeyen nötr kayıpların oluşumuna neden olur [71][72].

Düşük enerjili-çarpışma ile indüklenmiş parçalamada, öncül iyonların kiloelektronvolt enerjilere hızlandırılması ve ardından bir çarpışma hücreesindeki gaz atomları veya molekülleri ile çarpışmasıyla gerçekleştirilir. HCD, CID ile oldukça benzerdir ve aynı şekilde parçalamayla B- ve Y- tipi glikan fragmentleri oluşturur. CID ile aynı şekilde peptit omurga fragmentleri olan b- ve y- tipi fragment iyonları oluşturur. (Şekil 2.14.)



Şekil 2.13. Parçalama sonucu oluşan glikan birimlerine ait B- ve Y- tipi iyonların gösterimi.



Şekil 2.14. Parçalanma sonucu oluşan peptit fragment iyonların adlandırılması.

HCD, Orbitrap kütle spektrometrelerinde en yaygın olarak gerçekleştirilen bir parçalanma tekniğidir. HCD'de öncü iyonlar, iyon tuzağında izole edilir ve daha sonra bir çarpışma hücrelerine (C-tuzağı) aktarılır ve burada bir çarpışma gazıyla çarpılarak parçalanırlar. Ayrıca HCD, CID tekniğine göre oksanyum iyonları gibi küçük fragment iyonları daha verimli görülür. Basamaklı Çarpışma İle İndüklenmiş Çarpışma (sCID) tekniği, düşük ve yüksek çarpışma enerjilerinde, eş zamanlı olarak glikopeptidlerin hem glikan hem de peptit fragmentleri hakkında bilgi verir [73][74][75]. Uygulanacak enerji değerleri ayarlanır ve elde edilen tüm fragment iyonları tek bir spektrumda görülür.

Yang ve arkadaşları Q Exactive Plus kütle cihazında yüksek enerjili basamaklı c-trap ile parçalama (sHCD) yöntemi kullanarak glikopeptit analizi gerçekleştirmiştir. Elde ettiği sonuçlara göre, insan serum glikopeptitleri sHCD yöntemi uygulanarak yapıldığında HCD yöntemine göre daha yüksek skor sayısı ve daha fazla glikopeptit tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmaya göre, sHCD'de uygulanan daha düşük enerjide çoğunlukla glikozidik bağ bölünmesinden kaynaklanan fragment iyonları üretilirken, daha yüksek enerjide peptit omurgasının bölünmesinden kaynaklanan b ve y tipi iyonları üretilmiştir [76].

2.8.2. Elektron Çarpışma İle Parçalama (ECD)

Elektron Yakalamalı Parçalama Tekniği (ECD), düşük enerjili elektronlar ile çok yüklü iyonlar arasındaki etkileşimi içerir. Çok yüklü analit iyonları ($[M+nH]^{n+}$), kütlesi aynı ama yükü azaltılmış ürünleri ($[M+nH]^{(n-1)+}$) oluşturan düşük enerjili (<1 eV) bir elektronu (e^-) yakalar. Yükü azaltılmış türler, peptit omurgasındaki N-C α bağlarının bölünmesiyle sonuçlanan radikal güdümlü omurga ayrışmasına maruz kalır ve bu bölünme sonucu c-tipi ve z• tipi fragment iyonları oluşur. Burada c-tipi iyonları genellikle çift elektrondur ve z• tipi iyonları radikaldir. Diğer iyon aktivasyon yöntemlerinde altında kararlı olan disülfid bağları genelde ECD tekniğinde kırılır [77]. ECD genel olarak Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonans kütle spektrometrelerinde elde edilmiştir [78][79].

2.8.3. Elektron Transfer Parçalaması (ETD)

Elektron Transfer Parçalaması (ETD), ECD tekniği ile oldukça benzerdir fakat ECD'de geçerli olan iyon-elektron etkileşimi yerine ETD tekniği iyon-iyon etkileşimini içerir. ETD'de elektronları çok yüklü katyonik iyonlara ($[M+nH]^{n+}$) aktarmak için anyon elektron taşıyıcıları kullanılır, ardından tek elektron yükü azaltılmış ürünler ($[M+nH]^{(n-1)+}$) ve sonrasında fragment iyonları üretilir. ETD'deki en önemli kısım elektron transferi için kullanılan radikal anyonlardır. Bu anyon reaktifleri küçük, genellikle aromatik halkaya sahip olan moleküllerdir ve düşük elektron afinitelerine sahiptir. Genellikle tek yüklü floranten molekülü kullanılır [60].

Çok yüklü peptit iyonunun elektron elde etme yöntemi ECD ve ETD için farklılık gösterse de, parçalanma mekanizmaları ve ortaya çıkan kütle spektrumları benzerdir. Aynı şekilde c-tipi ve z• tipi fragment iyonları oluşur. Hem ECD hem de ETD, minimum PTM parçalanması ile peptit omurgasının detaylı parçalanmasını sağlar ve glikozilasyon bölgelerinin korunmasını sağlar. ETD/ECD, CID tekniğine göre peptit dizisi hakkında bilgi veren ağırlıklı olarak peptit omurga ürünleri üretir. Genellikle glikopeptitler, CID ve ECD/ETD teknikleri birlikte kullanılır [6][80]. ETD tekniği, TOF, dört kutuplular ve iyon tuzakları gibi daha uygun fiyatlı ve daha yaygın olarak bulunan birçok araç üzerinde gerçekleştirilebilir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmalarında yapılan çalışmalarda aksi belirtilmedikçe kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir. Çözücüler LC-MS grade saflıkta kullanılmıştır. Heptoglobulin varyantları (1-1, 2-2 ve Mixed) Biovision (Mountain View, CA, USA) firmasından temin edilmiştir. Deiyonize su (dH₂O), Expe-Ultrapure Su Sistemi (Mirae St., Korea) kullanılarak elde edildi.

3.2. Haptoglobulin Varyantlarının Çözeltide Proteolitik Parçalanması

İlk olarak Hpt'nin tüm varyantları (10 µg) indirgenmesi, 10 mM DTT kullanılarak 56 °C'de 40 dakika süresince gerçekleştirildi. Ardından, örneklerin alkilasyon işlemi için oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 20 mM IAA ile inkübe edildi. Son olarak, örnekler sırasıyla bir gece trypsin ve Glu-C ile, enzim/protein, 1/30 oranında, (w/w) olarak bir gece boyunca inkübe edildi. Kimyasallar 25 mM amonyum bikarbonat (ABC) kullanılarak hazırlandı.

3.3. N-glikopeptitlerin nLC-C18-ESI-sCID-MS/MS Analizi

Proteolitik parçalama sonucu oluşan peptitler, Ultimate 3000 RSLCnano sıvı kromatografisi (Dionex/Thermo Scientific) ile bir TIMS-TOF-MS (Bruker Daltonics, Bremen) kullanılarak analiz edildi. İyonizasyon, asetonitril ile zenginleştirilmiş azot gazı kullanılan bir captive nanoBooster kaynağıyla elde edildi. Peptitlerin analitik ayırımı, Acclaim PepMap 100 tuzak kolonu (100 µm × 5 cm, tanecik boyutu 5 µm, Dionex/Thermo Scientific) ve Acclaim PepMap RSLC C18 nano ayırma kolonları (75 µm × 15 ve 50 cm, tanecik boyutu 2 µm, Dionex/Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler, 10 µL/dk akış hızında yükleme tamponu (0.05% TFA içeren dH₂O) ile önce tuzak kolona yüklendi. Analitik ayırımlarda mobil faz A (0.1% formik asit içeren dH₂O) ve mobil faz B (0.1% formik asit içeren ACN) kullanıldı. Peptitlerin ayrılması için mobil faz B, 400 nL/dk akış hızıyla 5% ila 30% arasında 90 dakikada değiştirildi. Kolon fırın sıcaklığı 60 °C olarak ayarlandı. MS veri toplama, 1 Hz hızında m/z 50 ve m/z 2800 kütle aralığında gerçekleştirildi. Püskürtme gerilimi 1600 V olarak

analizler gerçekleştirildi. Kapiller sıcaklık değeri 150 °C olarak ayarlandı ve kurutma gazı 3 L/dk olarak kullanıldı. Basamaklı çarpışma ile indüklenmiş parçalama tekniği (Stepping Energy-CID), daha önce açıklandığı gibi temel adım modu kullanılarak MS/MS analizinde uygulandı [81]. Cihazın kütle kalibrasyonu, her dizi öncesi bir kalibrasyon karışım çözeltisi (Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Kütle spektrometrik analizden önce cihazın performansının değerlendirilmesi için, N-glikopeptitleri tanımlamak ve miktarlarını belirlemek için IgG sindirimleri (50-100 ng) kullanılarak cihaz test edildi. Her bir varyanttan 100 ng cihaza enjekte edilerek analizler gerçekleştirildi.

3.4. N-glikopeptitlerin nLC-C18-ESI-sHCD-MS/MS Analizi

Kütle spektrometrik analizler, Ultimate 3000 RSLC nano sıvı kromatografisi sistemi (Dionex/Thermo Scientific) ile birlikte çalışan easy-nano iyonlaştırma kaynağı entegre Thermo QExactive Plus cihazı ile gerçekleştirildi. Glikoproteomik analizler için 100 ng peptit karışımı cihaza enjekte edildi. Kromatografik ayırma sisteminde, Acclaim PepMap 100 tuzak kolonunu (100 µm × 5 cm, parçacık boyutu 5 µm, Dionex/Thermo Scientific) ve Acclaim PepMap RSLC C18 nano ayırma kolonunu (75 µm × 50 cm, parçacık boyutu 2 µm, Dionex/Thermo Scientific) kullanıldı. Hareketli faz olarak A) (0.1% formik asit içeren dH₂O) ve B) (%0,1'lik formik asit çözeltisi içeren ACN) çözücüleri gradient elüsyon olarak kullanıldı. Analizlerde B çözücüsünün %5'ten %30'a lineer olarak 90 dakikada ulaşması şeklinde program uygulandı. Kütle spektrometrik analizlerinde tam kütle spektrumları 375-2000 arasında alındı ve en yüksek intensitenin elde edildiği optimum kütle spektrum parametreleri altında basamaklı yüksek enerjili c-trap ile parçalama tekniği (Stepping Energy-HCD) modu kullanılarak gerçekleştirildi (NCE=20, 30 ve 40) [76]. AGC hedef değerleri MS1 ve MS2 için 1×10^6 ve 2×10^5 olarak ayarlandı. Kolon fırın sıcaklığı 60 °C olarak ayarlandı. Kapiler sıcaklık değeri 250 °C olarak ayarlandı. Püskürtme gerilimi 1800 V olarak analizler gerçekleştirildi. Kütle spektrometrik analizden önce cihazın performansının değerlendirilmesi için, N-glikopeptitleri tanımlamak ve miktarlarını belirlemek için IgG sindirimleri (50-100 ng) kullanılarak cihaz test edildi.

3.5. Glikopeptitlerin Belirlenmesi ve Veri Analizi

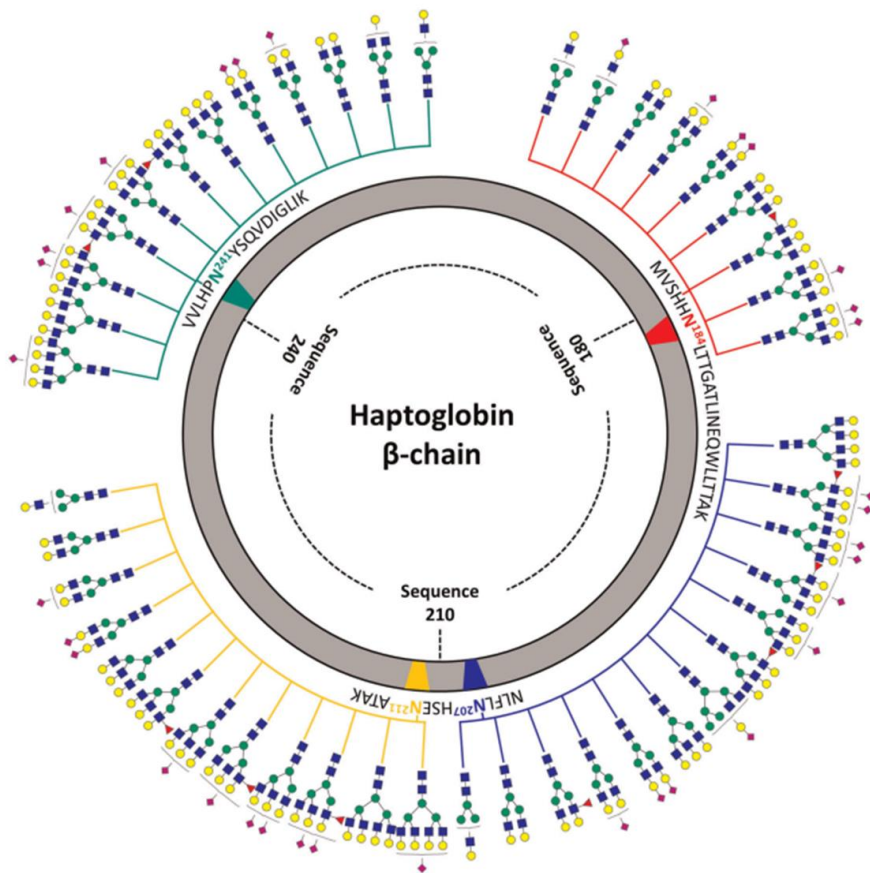
MS/MS verileri Byonic yazılımı (Protein Metrics INC, ABD) kullanılarak işlendi. Veriler, haptoglobulin ve varyantlarına ait sekanslar (FASTA dosyası) kullanılarak analiz edilmiştir. Yazılımda belirtilen ortak *N*-glikom veritabanı (Byonic'teki varsayılan 309 yaygın memeli *N*-glikanı) çalışmaya dahil edildi. Öncül iyonlar için kütleli tolerans, 20 ppm ve MS/MS iyonları için 0.05 Da olarak belirlendi. Değişken modifikasyon olarak oksidasyon seçildi. Arama için kütle aralığı 350 ila 5000 Da belirlendi. Skoru 30 ve üzeri olan glikopeptit sinyalleri anlamlı kabul edilmiştir.

Veriler PMI-Byonic Viewer yazılımından dışarı aktarılmıştır. Skor parametresine bağlı olarak filtreledikten sonra her bir glikozilasyon bölgesi için sınıflandırılmıştır. Ayrıca glikozilasyon yapısı, öncül iyonun yükü gibi parametrelere göre sınıflandırma gerçekleştirilmiştir. GrapPad Prism 9 yazılımı şekillerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Hpt 1-1 Varyantının QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) Sistemleri Kullanılarak Skor Analizleri

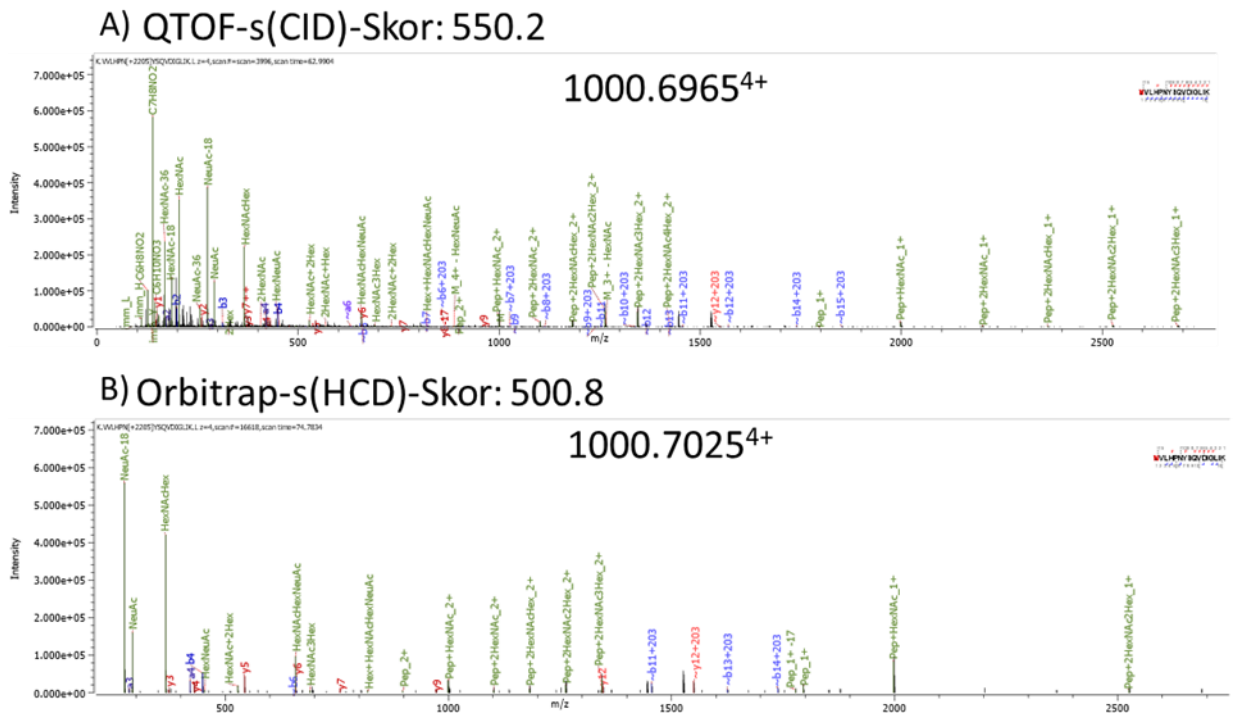
Karaciğer tarafından salgılanan, iltihaplanma ve kanser gibi hastalıklara cevap olarak hem protein seviyelerinde hem de glikozilasyon modifikasyonunda değişiklikler gösterdiklerinden oldukça önemli bir belirteçtir [82]. Haptoglobin (Hpt), karaciğer hemoglobinine bağlanıp iltihaplanma ve enfeksiyona karşı savunmada önemli bir rol oynayan akut faz proteinlerinden biridir. Her Hpt'nin çeşitli yapısal heterojenliği sadece amino asit dizisi varyantlarında değil, aynı zamanda birçok glikoformda da ortaya çıkar.



Şekil 4.1. Haptoglobin proteinin, β zincirindeki bölgeye özgü glikozilasyon haritasının şematik gösterimi [83].

Haptoglobulin proteininin Hpt-M, Hpt 1-1 ve Hpt 2-2 varyantları ticari olarak temin edilmiştir. Her bir varyant, çözelti ortamında tripsin ve glu-C ile enzimatik parçalama işlemlerine maruz bırakılmıştır. Her bir varyant, dört tekrarlı olacak şekilde hem QTOF s(CID) (basamaklı çarpışma ile indüklenmiş parçalama) hem de Q-Exactive Plus s(HCD) (basamaklı yüksek enerjili c-trap ile parçalama) sistemlerinde analiz edildi. Elde edilen veriler kıyaslanmak üzere ilk olarak Byonic yazılımı ile tespit edildi ve tespit edilen glikopeptitler, QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) sistemlerinde değerlendirilmiştir. İki cihazda da karşılaştırılmak üzere aynı glikozilasyon bölgesine ait aynı öncül iyon içeren glikopeptit seçilmiştir. Şekil 4.2.'de Hpt 1-1 varyantına ait Asn 241 glikozilasyon bölgesine sahip glikopeptidin MS/MS spektrumları görülmektedir.

HPT-1-1, Asn241, VVLHPNYSQVDIGLIK-Hex5HexNAc4NeuAc2



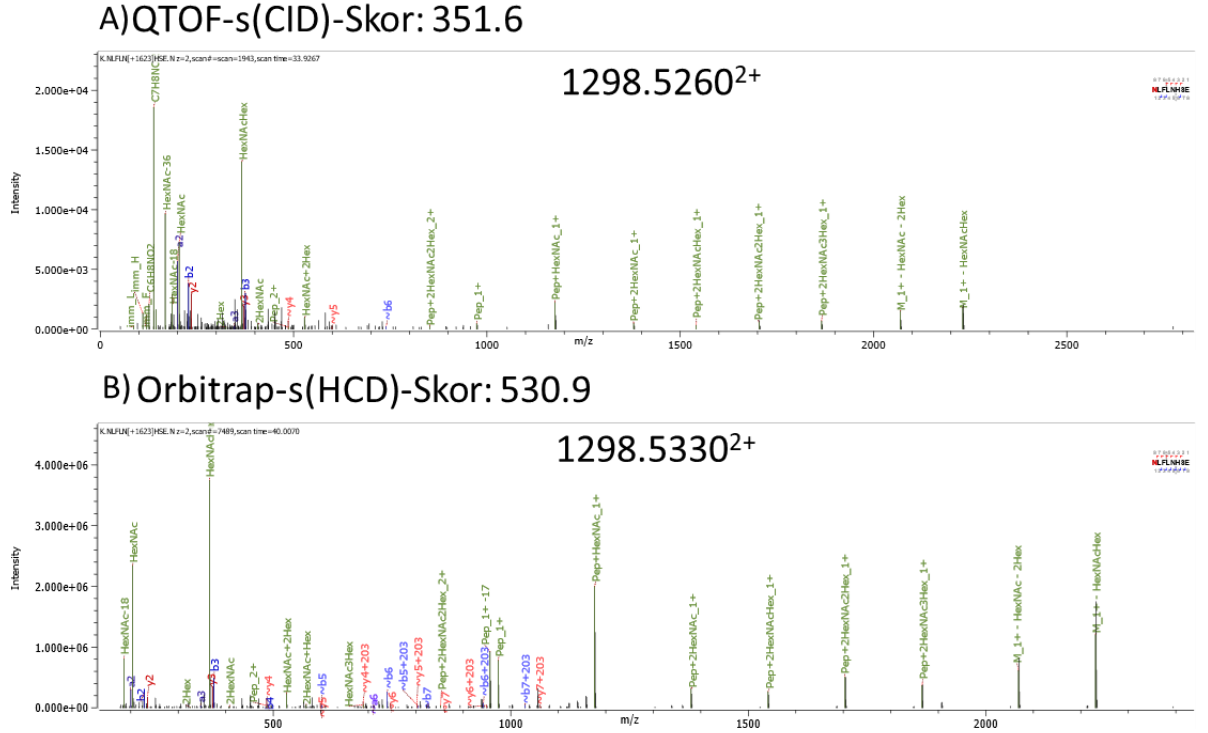
Şekil 4.2. Hpt 1-1 varyantının Asn 241 glikozilasyon bölgesine sahip +4 yüklü iyonlarının A) Orbitrap s(HCD) analiz cihazından ve B) QTOF s(CID) analiz cihazından elde edilen MS/MS spektrumları.

QTOF s(CID) sisteminde yapılan analizlerde 1000.69654+ m/z'e sahip öncül iyon belirlenirken, Orbitrap s(HCD) sisteminde yapılan analizlerinde 1000.70254+ m/z'e sahip öncül iyon belirlenmiştir. Bu glikopeptidin, "VVLHPNYSQVDIGLIK" peptit dizilimine sahip olduğu ve "Hex5HexNAc4NeuAc2" glikan yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre Hpt 1-1 varyantındaki aynı glikopeptit için QTOF s(CID) sisteminden elde edilen skor 550.2 iken Orbitrap s(HCD) sisteminden elde edilen skor 500.8 olarak bulunmuştur. Bu skor sonuçlarına göre Hpt 1-1 varyantının, seçilmiş kütledeki glikopeptit ve glikozilasyon bölgesine göre QTOF s(CID) sistemi, Orbitrap s(HCD) sistemine göre bu glikopeptidin tanımlanabilirliğine yönelik daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir.

4.2. Hpt 2-2 Varyantının QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) Sistemleri Kullanılarak Skor Analizleri

Şekil 4.3.'de Hpt 2-2 varyantına ait Asn 207 glikozilasyon bölgesine sahip glikopeptidin MS/MS spektrumları görülmektedir.

HPT-2-2, Asn207, NLFLNHSE-Hex5HexNAc4

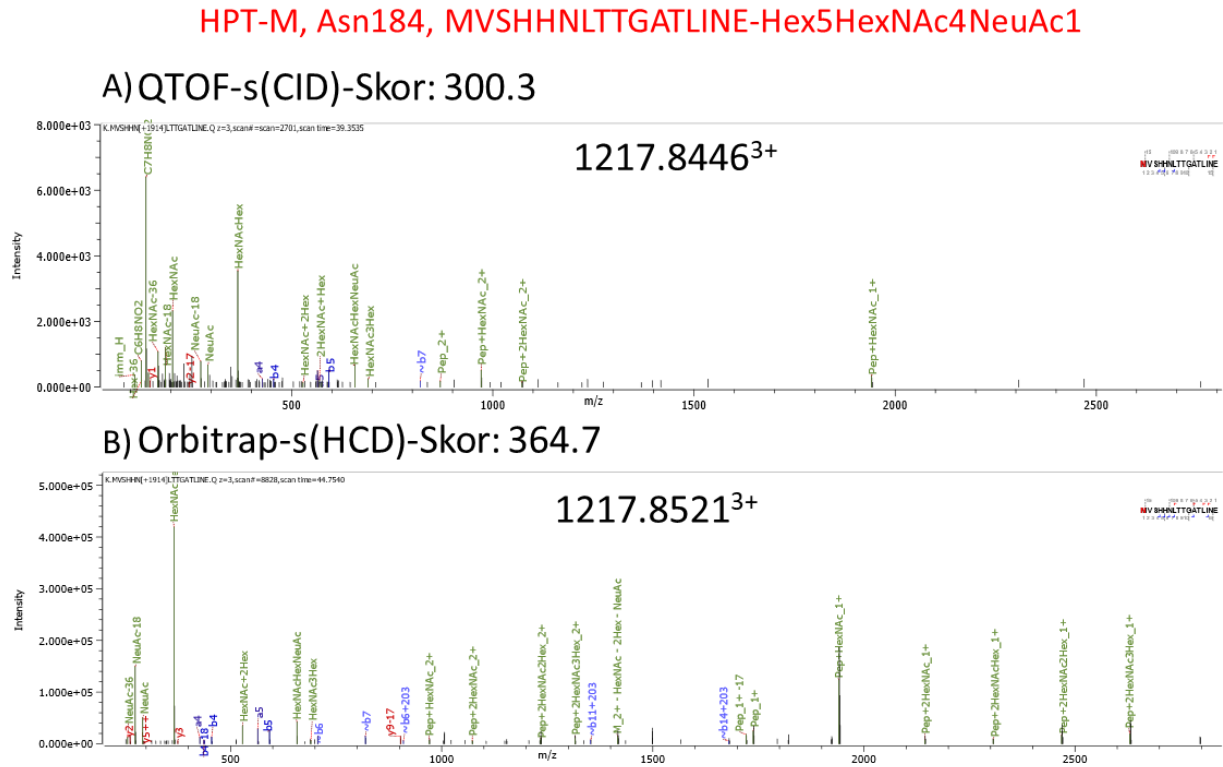


Şekil 4.3. Hpt 2-2 varyantının Asn 207 glikozilasyon bölgesine sahip +2 yüklü iyonlarının A) Orbitrap s(HCD) analiz cihazından ve B) QTOF s(CID) analiz cihazından elde edilen MS/MS spektrumları.

QTOF s(CID) sisteminde yapılan analizlerde 1298.52602+ m/z'e sahip öncül iyon belirlenirken, Orbitrap s(HCD) sisteminde yapılan analizlerde 1298.53302+ m/z'e sahip öncül iyon belirlenmiştir. Bu glikopeptidin, "NLFLNHSE" peptit dizilimine sahip olduğu ve "Hex5HexNAc4" glikan yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre Hpt 2-2 varyantındaki aynı glikopeptit için QTOF s(CID) sisteminden elde edilen skor 351.6 iken Orbitrap s(HCD) sisteminde elde edilen skor 530.9 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarına göre Hpt 2-2 varyantının, seçilmiş kütledeki glikopeptit ve glikozilasyon bölgesine göre, Orbitrap s(HCD) sisteminin QTOF s(CID) sistemine göre bu glikopeptidin tanımlanabilirliğine yönelik daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

4.3. Hpt-M Varyantının QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) Sistemleri kullanılarak Skor Analizleri

Şekil 4.4.'de Hpt-M varyantına ait Asn 184 glikozilasyon bölgesine sahip glikopeptidin MS/MS spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.4. Hpt-M varyantının Asn 184 glikozilasyon bölgesine sahip +3 yüklü iyonlarının A) Orbitrap s(HCD) analiz cihazından ve B) QTOF s(CID) analiz cihazından elde edilen MS/MS spektrumları.

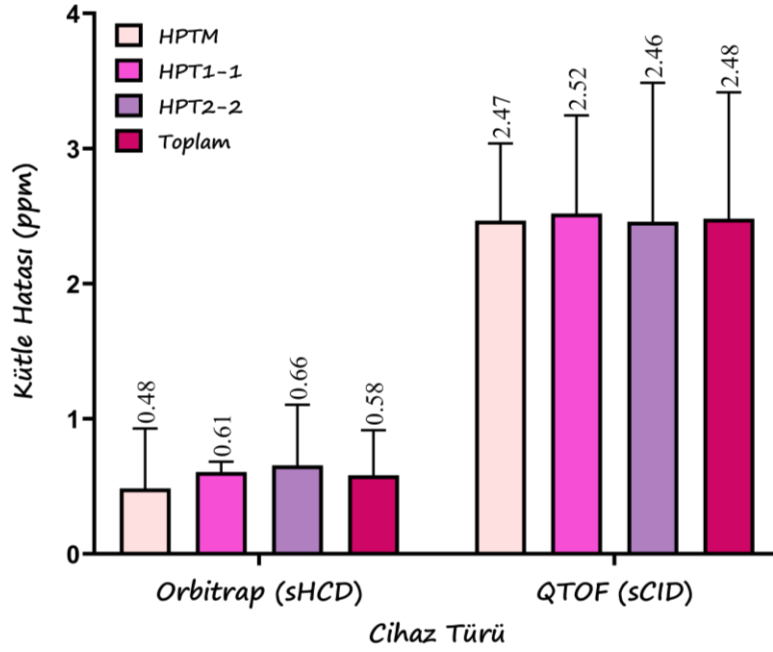
QTOF s(CID) cihazlarında yapılan analizlerde 1217.8446³⁺ m/z'e sahip öncül iyon bulunurken Orbitrap s(HCD) analizlerinde 1217.8521³⁺ m/z'e sahip öncül iyon belirlenmiştir. Bu glikopeptidin, "MVSHHNLTTGATLINE" peptid dizilimine sahip olduğu ve "Hex5HexNAc4NeuAc1" glikan yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre Hpt-M varyantındaki aynı glikopeptid için QTOF s(CID) sisteminden elde edilen skor 300.3 iken Orbitrap s(HCD) sisteminde elde edilen skor 364.7 olarak

bulunmuştur. Bu skor sonuçlarına göre Hpt-M varyantının, seçilmiş kütledeki glikopeptit ve glikozilasyon bölgesine göre, Orbitrap s(HCD) sisteminin QTOF s(CID) sistemine göre bu glikopeptidin tanımlanabilirliğine yönelik daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

Tez çalışmasının bu bölümünde haptoglobulin proteininin, her bir varyantı için farklı glikozilasyon bölgelerinde farklı glikopeptit örnekleri seçildi ve hem QTOF s(CID) (basamaklı çarpışma ile indüklenmiş parçalama hem de Q-Exactive Plus s(HCD) basamaklı yüksek enerjili çarpışma ile indüklenmiş parçalama sistemlerinde analiz edilmiştir. Hpt 1-1 varyantı için yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek skor QTOF s(CID) sisteminden, Hpt 2-2 varyantı için yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek skor Orbitrap s(HCD) sisteminden, Hpt-M varyantı için yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek skor Orbitrap s(HCD) sisteminden elde edilmiştir. Ayrıca burada sadece 3 farklı glikopeptit örneği için çalışmalar yapılmıştır.

4.4. Ortalama Kütle Hatası

Byonic yazılımı kullanılarak tespit edilen hem teorik glikopeptit iyonları hem de deneysel tespit edilen glikopeptit iyonları çalışmada değerlendirilmiştir. Alınan kütle hatası (ppm) verileri Graphpad Prism yazılımı kullanılarak grafikleştirilmiştir. Şekil 4.5.'de QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) sistemlerinden elde edilen analizler sonucunda ortalama kütle hatalarına ait değerler görülmektedir.

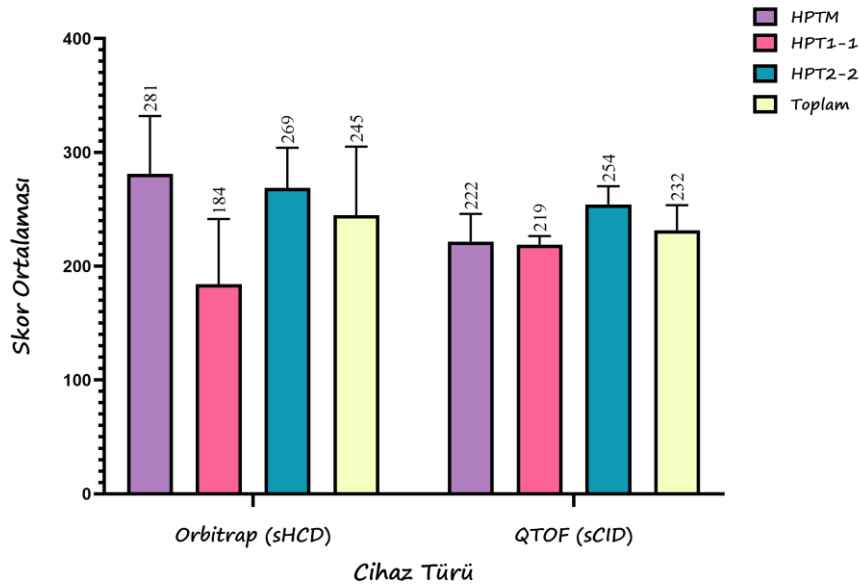


Şekil 4.5. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazları kullanılarak elde edilen MS/MS kütle hatası (ppm) verilerinin kıyaslanması.

Kullanılan heptaglobulin proteininin tüm varyantları, aynı şekilde değerlendirilmiştir. Glikopeptitlerin, eş zamanlı MS/MS analizlerinde iki yöntem arasında farklılık vardır. Aynı zamanda tüm varyantlar birleştirilerek toplam skor sayısı değeri elde edilmiştir. Orbitrap s(HCD) cihazında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için ortalama kütle hatası değerleri sırasıyla 0.61, 0.66, 0.48 olarak belirlenmiştir. QTOF s(CID) cihazında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için ortalama kütle hatası değerleri sırasıyla 2.52, 2.46, 2.47 olarak belirlenmiştir. Orbitrap s(HCD) cihazından elde edilen tüm varyantlardaki glikopeptitlerin, toplam kütle hatası değeri 0.58 olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde QTOF s(CID) cihazından elde edilen tüm varyantlardaki glikopeptitlerin, toplam kütle hatası değeri 2.48 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak Orbitrap s(HCD) sistemiyle yapılan analizlerde tüm varyantlar için daha yüksek kütle doğruluğu elde edilmiştir. Dolayısıyla Orbitrap s(HCD) sistemi, kütle için çok hassas algılanmasını sağlar ve bu yüzden glikopeptitlerin iyi tanımlanmasını sağlar.

4.5. Toplam Ortalama Skor Sayısı

Çalışmada tüm glikopeptitlerin ve tüm glikozilasyonları içeren toplam ortalama skor sayıları verilmiştir. QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) cihazlarında tespit edilen toplam ortalama skor sayıları Şekil 4.6.'de belirlenmiştir.



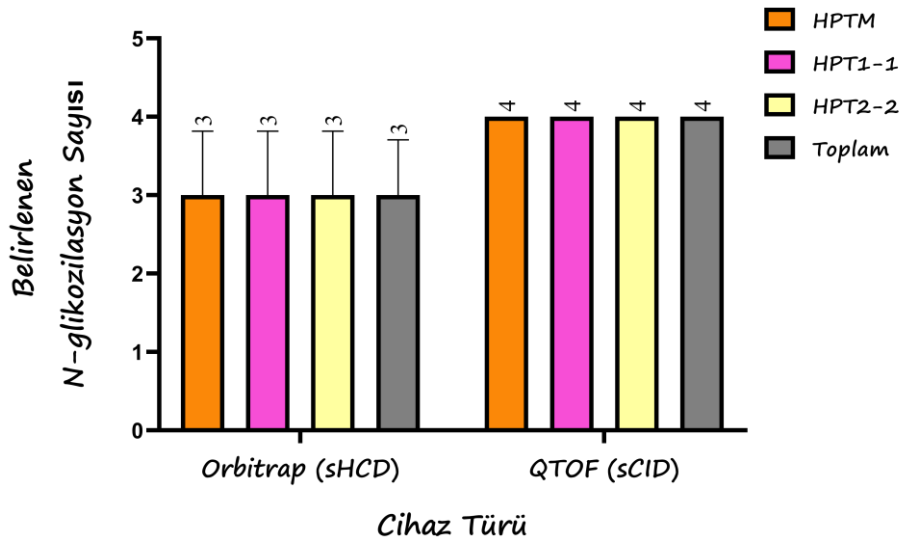
Şekil 4.6. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazları kullanılarak elde edilen toplam ortalama skor sayılarının kıyaslanması.

QTOF s(CID) cihazı ile gerçekleştirilen analiz sonuçlarında, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için glikopeptitlerin ortalama skor sayısı değerleri sırasıyla 219, 254, 222 olarak belirlenmiştir. Orbitrap s(HCD) ile gerçekleştirilen sonuçlarında, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için glikopeptitlerin ortalama skor sayısı değerleri sırasıyla 184, 269, 281 olarak bulunmuştur. Tüm varyantlar için elde edilen toplam ortalama skor sayısı, Orbitrap s(HCD) sistemi için 245, QTOF s(CID) sistemi için 232 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre Hpt 2-2, Hpt-M için, Orbitrap s(HCD) kütle cihazından elde edilen ortalama skor sayısı, QTOF s(CID) cihazından elde edilen ortalama skor sayısından daha fazla skor sayısı tespit etmiştir. Buna karşılık Hpt 1-1 varyantı için, QTOF s(HCD) cihazından elde edilen ortalama skor sayısı, Orbitrap s(HCD) cihazından elde edilen ortalama skor sayısından daha fazla hesaplanmıştır. Orbitrap s(HCD) sisteminde analizi

gerçekleştirilen Hpt 1-1 varyantının diğer varyantlara göre hata payı daha fazladır. Bu sistematik hatadan kaynaklanmaktadır.

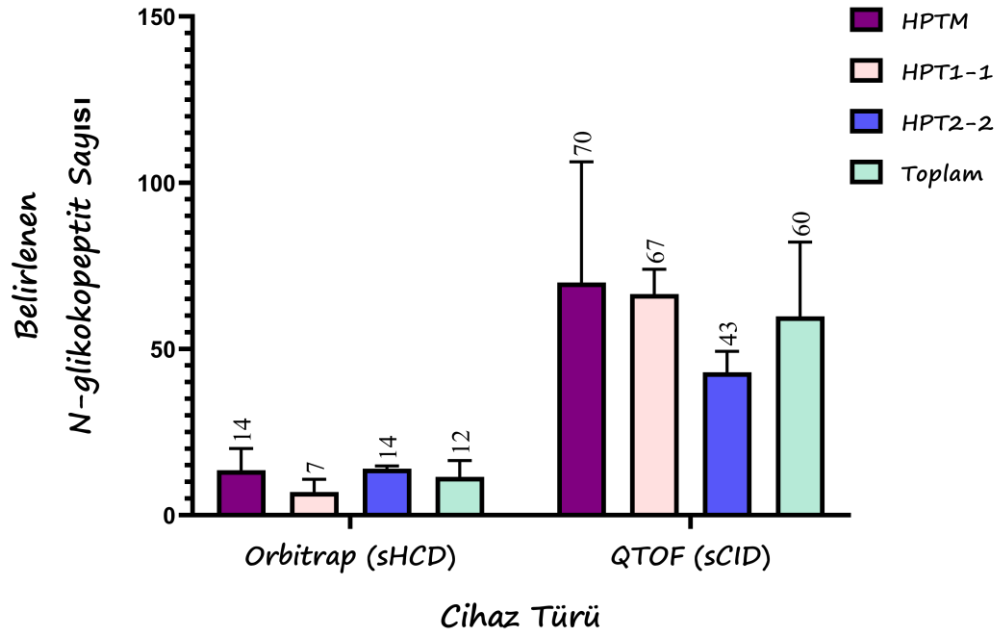
4.6. Tespit Edilen Glikozilasyon Bölgesi Sayısı ve Tespit Edilen N-Glikopeptit Sayısı

N-glikozilasyon bölgesi ve N-glikopeptit sayılarının tespit edilmesi için iki sistem kıyaslanmıştır. QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) cihazlarında tespit edilen N-glikozilasyon sayısı ve tespit edilen N-glikopeptit sayısı Şekil 4.7.'de ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Belirlenen N-glikozilasyon sayısının, Orbitrap s(HCD) ve B) QTOF s(CID) cihazlarında kıyaslanması.

Asp 184, Asn 207, Asn 211 ve Asn 241'de bulunan Hpt'nin beta zincirinde dört N-glikozilasyon bölgesi tanımlanmıştır. Aynı cihazlarda analiz edilen Hpt'nin her bir varyantı için aynı sayıda glikozilasyon bölgesi bulunmuştur. Glikozilasyon bölgeleri incelendiğinde Orbitrap s(HCD) sisteminde sağlanan veriler sonucunda Hpt'nin 4 tane glikozilasyon bölgesinden 3 tanesi tespit edilmiştir. QTOF s(CID) sisteminde ise 4 tane glikozilasyon bölgesinden 4'ünde tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre QTOF s(CID) sistemi ile yapıdaki tüm N-glikozilasyon bölgeleri tespit edilmiştir.

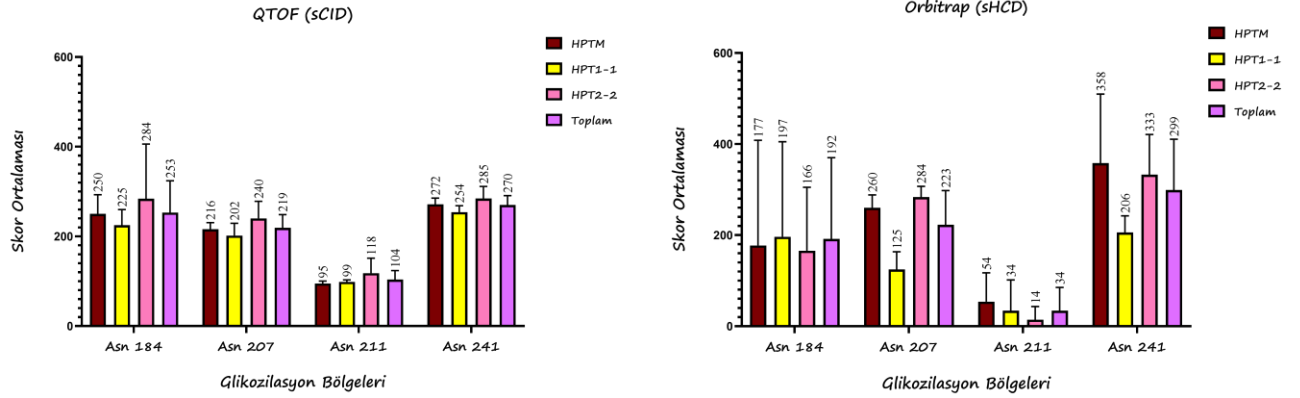


Şekil 4.8. Belirlenen N-glikopeptit sayısının, Orbitrap s(HCD) ve B) QTOF s(CID) cihazlarında kıyaslanması.

Orbitrap s(HCD) cihazında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için N-glikopeptit sayısı sırasıyla 7, 14, 14 olarak belirlenmiştir. QTOF s(CID) cihazında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için N-glikopeptit sayısı sırasıyla 67, 43, 70 olarak belirlenmiştir ve ayrıca tüm varyantlardaki toplam ortalama N-glikopeptit sayısı, QTOF s(CID) sisteminde yapılan analizlerde 60, olarak Orbitrap s(HCD) sisteminde ise 12 olarak belirlenmiştir. Her iki sistemde yapılan analiz sonuçlarına göre, QTOF s(CID) sistemiyle yapılan analizlerde daha yüksek oranda glikopeptit tespit edildiği belirlenmiştir.

4.7. Tespit Edilen Glikozilasyon Bölgelerinin İncelenmesi.

QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) cihazlarında tespit edilen tüm glikozilasyon bölgelerinin skor ortalamaları Şekil 4.9.'da verilmiştir.

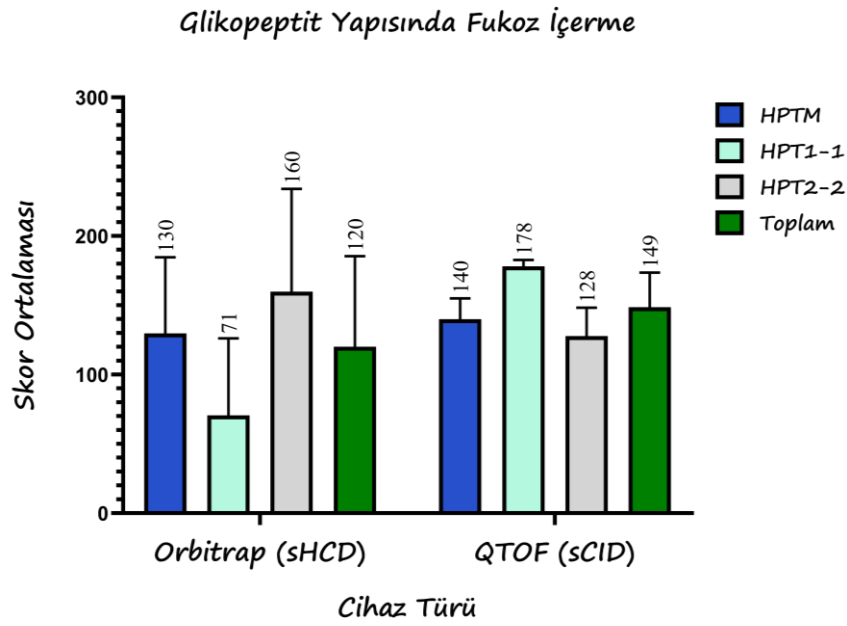


Şekil 4.9. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazlarında tüm glikozilasyon bölgelerinin skor ortalamaları analizlerinin kıyaslanması.

Tüm varyantlara ait tüm glikozilasyon bölgeleri analiz edilip skor değerleri alınmıştır. Bu sonuçlara göre Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazlarında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için Asn 241 glikozilasyon bölgesinde en yüksek ortalama skor değeri belirlenmiştir. İki cihazda yapılan analiz sonuçlarına göre Asn 211 glikozilasyon bölgesinde en düşük ortalama skor değeri görülmüştür. Asn 184 ve Asn 211 glikozilasyon bölgelerinin için QTOF s(CID) cihazı yüksek skor değeri vermişken, Asn 207 ve Asn 241 glikozilasyon bölgelerinde Orbitrap s(HCD) cihazı yüksek skor değerleri vermiştir.

4.8. Glikopeptit Yapısında Fukoz Birimi İçerme Durumuna Bağlı Olarak Skor Sayılarının İncelenmesi.

Tez çalışmalarının bu kısmında her bir varyant için, elde edilen tüm glikopeptitlerin yapılarında bulunan Fukoz (Fuc) glikan birimlerinin ortalama skor sayıları tespit edilmiştir. Şekil 4.10.'da QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) sistemlerinden elde edilen glikopeptitlerin yapılarında fukoz bulundurma durumuna göre ortalama skor sayıları gösterilmiştir.



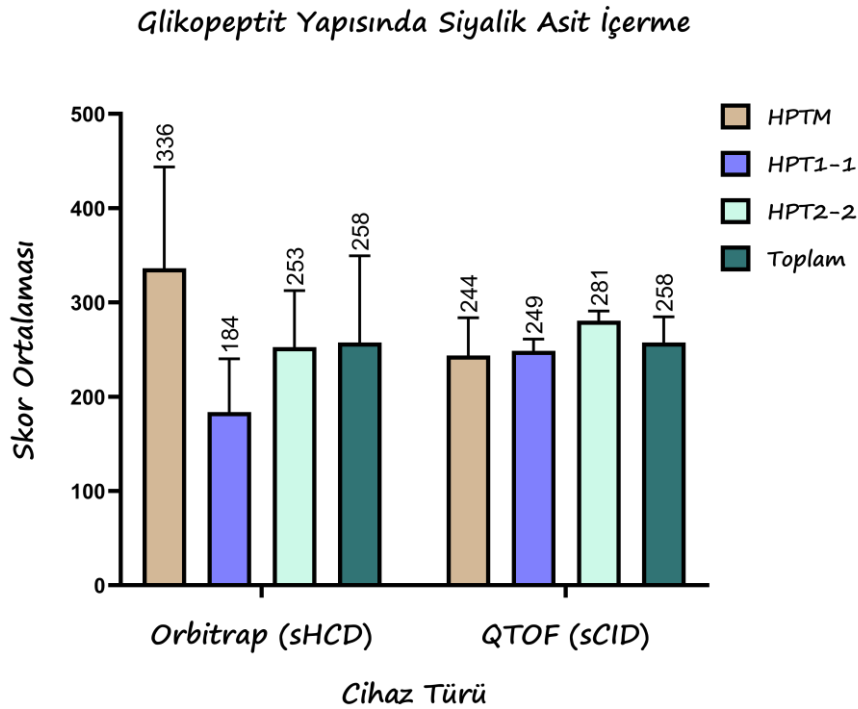
Şekil 4.10. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazlarında glikopeptitlerin yapılarında fukoz bulundurma durumuna göre yapılan analizlerin kıyaslanması.

Orbitrap s(HCD) cihazında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için glikopeptitlerin yapılarında fukoz bulundurma durumuna göre ortalama skor sayısı sonuçları sırasıyla 71, 160, 130 olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.7) QTOF s(CID) cihazında yapılan analizlerde ise, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için glikopeptitlerin yapılarında fukoz bulundurma durumuna göre ortalama skor sayıları sırasıyla 178, 128, 140 olarak hesaplanmıştır. Orbitrap s(HCD) cihazında yapılan tüm varyantlardaki glikopeptitlerin yapılarında bulunan fukoz bulundurma analizleri için toplam ortalama skor sayısı 120 olarak belirlenmiştir.. Aynı şekilde QTOF s(CID) cihazında yapılan tüm varyantlardaki

glikopeptitlerin yapılarında bulunan fukoz bulundurma analizleri için toplam ortalama skor sayısı 149 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak Orbitrap s(HCD) sistemiyle yapılan analizlerde Hpt 2-2 varyantı için daha yüksek skor sayısı elde edilirken, QTOF s(CID) sistemiyle yapılan analizlerde Hpt 1-1 ve Hpt M varyantı için daha yüksek skor sayısı elde edilmiştir. Tüm varyantlar için en yüksek toplam ortalama skor sayısı, QTOF s(CID) sisteminde yapılan analiz sonuçlarında görülmüştür.

4.9. Glikopeptit Yapısında Siyalik Asit Birimi İçerme Durumuna Bağlı Olarak Skor Sayılarının İncelenmesi.

Her bir varyant için, elde edilen tüm glikopeptitlerin yapılarında bulunan siyalik asitlerin (NeuAc) ortalama skor sayıları tespit edilmiştir. Şekil 4.11.'de QTOF s(CID) ve Orbitrap s(HCD) sistemlerinden elde edilen verilerin glikopeptitlerin yapılarında siyalik asit bulundurma durumuna göre ortalama skor sayıları gösterilmiştir.

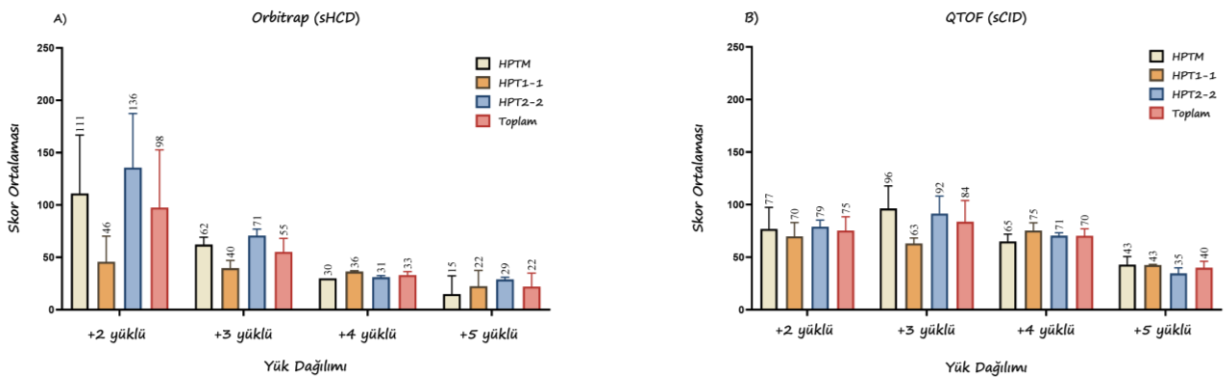


Şekil 4.11. Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazlarında glikopeptitlerin yapılarında siyalik asit bulunma durumuna göre yapılan analizlerin kıyaslanması.

Orbitrap s(HCD) cihazında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için glikopeptitlerin yapılarında siyalik asit bulunma durumuna göre ortalama skor sayısı değerleri sırasıyla 184, 253, 336 olarak hesaplanmıştır. QTOF s(CID) cihazında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için glikopeptitlerin yapılarında siyalik asit bulunma durumuna göre ortalama skor sayısı değerleri sırasıyla 249, 281, 244 olarak belirlenmiştir. İki sistem için de yapılan analiz sonucuna göre, tüm varyantlardaki glikopeptitlerin yapılarında bulunan siyalik asit içerme analizleri için toplam ortalama skor sayısı değeri 258 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak Orbitrap s(HCD) sistemiyle yapılan analizlerde Hpt M varyantı için daha yüksek skor sayısı elde edilirken, QTOF s(CID) sistemiyle yapılan analizlerde Hpt 1-1 ve Hpt 2-2 varyantı için daha yüksek skor sayısı elde edilmiştir.

4.10. Öncül İyonların Yüküne Bağlı Olarak Skor Sayılarının İncelenmesi.

Çalışmada, her bir varyant için +2 yüklü öncül iyonların, +3 yüklü öncül iyonların, +4 yüklü öncül iyonların ve +5 yüklü öncül iyonların her iki cihazda da ortalama skor sayıları analiz edilmiştir. Şekil 4.12.' de tüm varyantlar için Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazında yapılan analizlerde +2 yüklü öncül iyonların, +3 yüklü öncül iyonların, +4 yüklü öncül iyonların ve +5 yüklü öncül iyonların ortalama skor sayıları gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Farklı yük dağılımlarının ortalama skor sayıları üzerine A) Orbitrap s(HCD) ve B) QTOF s(CID) cihazlarında kıyaslanması.

Orbitrap s(HCD) sisteminde tüm varyantlar için +2 yüklü, +3 yüklü, +4 yüklü ve +5 yüklü glikopeptitlerin ortalama skor sayısı değerlerinde, en yüksek skor dağılımının +2 yüklü glikopeptitlerden geldiği görülmüştür. QTOF s(CID) sisteminde yapılan analiz sonuçlarını kıyasladığımızda ise Hpt 2-2 ve Hpt-M varyantları en yüksek skor sayı değerinin +3 yüklü glikopeptitlerden, Hpt 1-1 için ise +4 yüklü glikopeptitlerden geldiği görülmüştür. QTOF s(CID) sisteminde yapılan analiz sonuçlarına göre tüm varyantlar için +4 yüklü öncül iyonların verdiği ortalama skor sayısı değerleri ile +2 yüklü öncül iyonların verdiği ortalama skor sayısı değerleri birbirine yakındır. Ayrıca iki sistemde yapılan çalışmalarda tüm varyantlar için +5 yüklü öncül iyonlar, en az skor sayısı değeri vermiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, glikopeptit analizi için hem QTOF s(CID) (basamaklı çarpışma ile indüklenmiş parçalama) hem de Q-Exactive Plus s(HCD) (basamaklı yüksek enerjili çarpışma ile indüklenmiş parçalama) sistemlerinde analizler yapılmış olup, elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır. Her iki sistem kullanılarak yapılan glikopeptit tanımlama analizleri verimli sonuçlar vermiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre, glikozilasyon bölgesi ve glikopeptit sayısı analizlerinde QTOF s(CID)'un daha verimli olduğu, kütle hatası analizlerinde Orbitrap s(HCD)'in daha yüksek kütle doğruluğu sağladığı, toplam ortalama skor sayısı analizlerinde Orbitrap s(HCD)'in daha yüksek skor sayısı verdiği belirlenmiştir.

Kullanılan her iki teknolojiye bazı benzerlikleri paylaşırsak da, iki enstrüman arasında not edilmesi gereken önemli sınırlamalar vardır. Orbitrap s(HCD)'in kütle çözünürlüğü QTOF s(CID) sistemlerinden daha yüksektir. Orbitrap s(HCD) cihazına gelen iyonlara ait pikleri birbirinden ayırmak, yapıları hakkında doğru bilgiler sağlar. QTOF s(CID) ile yapılan çalışmalarda asetonitril ile zenginleştirilmiş nebulizatör gazı kullanılmıştır. Orbitrap s(HCD) sisteminde bu durum söz konusu değildir. Yapılan bir çalışmada asetonitril ile zenginleştirilmiş nebulizatör gazının iyonların iyonlaşma verimini arttırdığı ve pik intensitesini yükselttiği gözlenmiştir [84]. Tez kapsamında zenginleştirme işlemi yapılsaydı daha verimli sonuçlara ulaşılabilirdi. Glikopeptit zenginleştirme yöntemi, MS analizinde glikopeptit intensitesini önemli ölçüde iyileştirmiş ve glikopeptit olmayan

kütle spektrumlarında glikopeptitin sinyal baskılamasını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [85]. Ayrıca İyonlaştırma parametresi olarak, QTOF s(CID) sisteminde CaptiveSpray, Orbitrap s(HCD) sisteminde ise EASY-Spray kullanılmıştır. Naoelektrosprey iyonizasyonu, daha küçük damlacıklar oluşturarak daha yüksek hassasiyet sağlar ve nL/dk aralığında çözelti akışı sağlar. Düşük miktarda analizler için oldukça faydalı bir tekniktir [86][87].

Literatürde iki enstrümanda basamaklı çarpışma tekniği kullanılarak yapılan glikopeptit tanımlama performansları kıyaslanması ilk kez bu yüksek lisans çalışmasında uygulanmıştır. Hinneburg ve arkadaşları, glikopeptitlerin karakterizasyonu için QTOF s(CID) sistemini kullanmıştır. Bu sistem hem yüksek enerji hem de düşük enerjili CID'nin özelliklerini birleştirmiştir. Daha yüksek enerjiyle gelen peptidin, glikanın yapısını bozmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bölgeye özgü glikozilasyon çalışmalarında oldukça başarılı olduğunu görmüştür [81]. Bir diğer çalışmada ise Q Exactive Plus kütle cihazında yüksek enerjili basamaklı c-trap ile çarpışma (sHCD) yöntemi kullanarak glikopeptit analizini etkili bir şekilde gerçekleştirmiştir [76].

5. YORUM

Haptoglobin (Hpt) proteininin, Hpt 1-1, Hpt 2-2 ve Hpt-M adı verilen bu üç farklı varyant tez çalışmasında kullanılmıştır. Her bir varyant, dört tekrarlı olacak şekilde hem QTOF s(CID) (basamaklı çarpışma ile indüklenmiş parçalama) hem de Q-Exactive Plus s(HCD) (basamaklı yüksek enerjili c-trap ile parçalama) sistemlerinde analiz edildi. Bu tez çalışmasında elde edilen verilere göre aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Her bir varyanta göre tespit edilen glikozilasyon bölgesi için kıyaslamalar yapılmıştır. Hpt 1-1 varyantının Asn 241 glikolizasyon bölgesini içeren glikopeptidinin MS/MS analizlerinde QTOF s(CID) sisteminin Orbitrap s(HCD) sistemine kıyasla daha yüksek skor elde edildiği görülmüştür.
- Hpt 2-2 varyantının Asn 207 glikolizasyon bölgesini içeren glikopeptidinin MS/MS analizlerinde Orbitrap s(HCD) sisteminin QTOF s(CID) sistemine kıyasla daha yüksek skor elde edildiği görülmüştür.
- Hpt-M varyantının Asn 184 glikolizasyon bölgesini içeren glikopeptidinin MS/MS analizlerinde Orbitrap s(HCD) sisteminin QTOF s(CID) sistemine kıyasla daha yüksek skor elde edildiği görülmüştür.
- Tüm varyantlar için, Orbitrap s(HCD) sistemiyle yapılan analizlerde daha yüksek kütle doğruluğu elde edilmiştir.
- Hpt 2-2, Hpt-M varyantları için elde edilen ortalama skor sayısı Orbitrap s(HCD) kütle cihazında daha yüksek iken, QTOF s(HCD) cihazından elde edilen ortalama skor sayısının Hpt 1-1 varyantında daha yüksek olduğu görülmüştür. Toplam ortalama skor değerlerinde ise tüm varyantlarda Orbitrap s(HCD) cihazında yapılan analizlerde daha yüksek skor sayısı tespit edilmiştir.
- Orbitrap s(HCD) sistemi ile yapılan analizlerde tüm varyantlar için 3 tane glikozilasyon bölgesi tespit edilmiştir. QTOF s(CID) sistemiyle yapılan analizlerde ise yine tüm varyantlar için 4 tane glikozilasyon bölgesi tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre QTOF s(CID) sistemiyle yapılan analizlerde yapıdaki tüm glikozilasyon bölgelerinin tespit edildiği görülmüştür. Tüm varyantlarda, QTOF s(CID) sisteminin Orbitrap s(HCD) sistemine kıyasla daha yüksek glikopeptit tanımladığı görülmüştür.

- Orbitrap s(HCD) ve QTOF s(CID) cihazlarında yapılan analizlerde, Hpt 1-1, Hpt 2-2, Hpt-M için Asn 241 glikozilasyon bölgesinde en yüksek ortalama skor değeri belirlenmiştir. Asn 184 ve Asn 211 glikozilasyon bölgelerinin için QTOF s(CID) cihazı yüksek skor değeri vermişken, Asn 207 ve Asn 241 glikozilasyon bölgelerinde Orbitrap s(HCD) cihazı yüksek skor değerleri vermiştir.
- Tüm varyantlardaki glikopeptitlerin yapılarında fukoz birimini içermesi analizleri TOF s(CID) sisteminde daha yüksek toplam ortalama skor sayısı tespit edilmiştir. Orbitrap s(HCD) sistemiyle yapılan analizlerde Hpt 2-2 varyantı için glikopeptit yapısında daha fazla fukoz birimi tespit edilirken, QTOF s(CID) sistemiyle yapılan analizlerde Hpt 1-1 ve Hpt-M varyantı için glikopeptit yapısında daha fazla fukoz birimi tespit edilmiştir.
- Orbitrap s(HCD) sistemiyle yapılan analizler sonucunda Hpt-M varyantı için glikopeptitlerin yapılarında daha fazla siyalik asit birimi tespit edilirken, QTOF s(CID) sistemiyle yapılan analizlerde Hpt 1-1 ve Hpt 2-2 varyantı için daha fazla siyalik asit birimi tespit edilmiştir. İki sistem için de yapılan analiz sonucuna göre, tüm varyantlardaki glikopeptitlerin yapılarında bulunan siyalik asit içermesi analizleri için toplam ortalama skor sayılarında büyük farklılık görülmemiştir.
- Orbitrap s(HCD) sisteminde yapılan tüm varyantlar için +2 yüklü, +3 yüklü, +4 yüklü ve +5 yüklü glikopeptitlerin arasından elde edilen en yüksek skor sayısı, +2 yüklü glikopeptitlerin sağladığı skor değeri olmuştur. QTOF s(CID) sisteminde yapılan analiz sonuçlarını kıyasladığımızda ise Hpt 2-2 ve Hpt-M varyantları en yüksek skor değerinin +3 yüklü glikopeptitlerden, Hpt 1-1 için ise +4 yüklü glikopeptitlerden geldiği görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- [1] S. Jeong *et al.*, “Detection of aberrant glycosylation of serum haptoglobin for gastric cancer diagnosis using a middle-up-down glycoproteome platform,” *Journal of Personalized Medicine*, vol. 11, no. 6, 2021, doi: 10.3390/jpm11060575.
- [2] J. J. Thomson and P. R. S. L. A., “Bakerian Lecture :—Rays of positive electricity ,” *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, vol. 89, no. 607, pp. 1–20, 1913, doi: 10.1098/rspa.1913.0057.
- [3] H. Budzikiewicz and R. D. Grigsby, “Mass spectrometry and isotopes: A century of research and discussion,” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 25, no. 1, pp. 146–157, 2006, doi: 10.1002/mas.20061.
- [4] I. Ojanperä, M. Kolmonen, and A. Pelander, “Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 403, no. 5, pp. 1203–1220, 2012, doi: 10.1007/s00216-012-5726-z.
- [5] S. D. Richardson, “Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues,” *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 2, pp. 747–778, 2012, doi: 10.1021/ac202903d.
- [6] Y. Mechref, “Use of CID/ETD mass spectrometry to analyze glycopeptides,” *Current Protocols in Protein Science*, vol. 1, no. SUPPL.68, 2012, doi: 10.1002/0471140864.ps1211s68.
- [7] R. C. Dougherty and K. Piotrowska, “Screening by negative chemical ionization mass spectrometry for environmental contamination with toxic residues: Application to human urines,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 6, pp. 1777–1781, 1976, doi: 10.1073/pnas.73.6.1777.
- [8] C. A. Bauer and S. Grimme, “How to Compute Electron Ionization Mass Spectra from First Principles,” *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 120, no. 21, pp. 3755–3766, 2016, doi: 10.1021/acs.jpca.6b02907.
- [9] G. Bolbach, “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Analysis of Non-

- Covalent Complexes: Fundamentals and Applications,” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 11, no. 20, pp. 2535–2557, 2005, doi: 10.2174/1381612054546923.
- [10] J. Rappsilber, M. Moniatte, M. L. Nielsen, A. V. Podtelejnikov, and M. Mann, “Experiences and perspectives of MALDI MS and MS/MS in proteomic research,” *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 226, no. 1, pp. 223–237, 2003, doi: 10.1016/S1387-3806(02)00976-4.
- [11] M. W. F. Nielen, “Maldi time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers,” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 18, no. 5, pp. 309–344, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18:5<309::AID-MAS2>3.0.CO;2-L.
- [12] C. H. Hocart, “Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification,” in *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, in *Comprehensive Natural Products II*, Charles H. Hocart, Ed. Australia, 2010, pp. 339–340.
- [13] G. L. Glish and R. W. Vachet, “The basics of mass spectrometry in the twenty-first century,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 2, no. 2, pp. 140–150, 2003, doi: 10.1038/nrd1011.
- [14] S. Banerjee and S. Mazumdar, “Electrospray Ionization Mass Spectrometry : A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte,” vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/282574.
- [15] J. L. Beck, M. L. Colgrave, S. F. Ralph, and M. M. Shei, “Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs, metals, and proteins,” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 20, no. 2, pp. 61–87, 2001, doi: 10.1002/mas.1003.
- [16] S. Milne, P. Ivanova, J. Forrester, and H. Alex Brown, “Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS,” *Methods*, vol. 39, no. 2, pp. 92–103, 2006, doi: 10.1016/j.ymeth.2006.05.014.
- [17] E. Honarvar and A. R. Venter, “Comparing the Effects of Additives on Protein Analysis Between Desorption Electrospray (DESI) and Electrospray Ionization (ESI),” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 29, no. 12, pp. 2443–2455, 2018, doi: 10.1007/s13361-018-2058-z.
- [18] M. S. Wilm and M. Mann, “Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole’s beam of

- macromolecules at last?," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 136, no. 2–3, pp. 167–180, 1994, doi: 10.1016/0168-1176(94)04024-9.
- [19] A. T. Iavarone and E. R. Williams, "Mechanism of charging and supercharging molecules in electrospray ionization," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 8, pp. 2319–2327, 2003, doi: 10.1021/ja021202t.
- [20] A. M. Haag, "Mass analyzers and mass spectrometers," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 919, Switzerland: Springer International, 2016, p. 158.
- [21] J. J. Leary and R. L. Schmidt, "Quadrupole mass spectrometers: An intuitive look at the Math," *Journal of Chemical Education*, vol. 73, no. 12, 1996, doi: 10.1021/ed073p1142.
- [22] C. Steel and M. Henchman, "Understanding the quadrupole mass filter through computer simulation," *Journal of Chemical Education*, vol. 75, no. 8, pp. 1049–1054, 1998, doi: 10.1021/ed075p1049.
- [23] R. N. Hayes and M. L. Gross, "Collision-induced dissociation," in *Methods in Enzymology*, vol. 193, no. C, 1990, pp. 237–238.
- [24] G. Kaklamanos, E. Aprea, and G. Theodoridis, *Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation*, 1st ed. Elsevier Ltd., 2015.
- [25] G. Hopfgartner, "Theory and Instrumentation of Mass Spectrometry," in *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Disposition: Basic Principles and Applications*, 2011, pp. 257–287.
- [26] J. T. Watson, O. D. Sparkman, and J. Wiley, *Introduction to MS in Bioanalytics*. 2007.
- [27] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, and B. A. Thomson, "An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 36, no. 8, pp. 849–865, 2001, doi: 10.1002/jms.207.
- [28] B. Cañas Montalvo, D. López-Ferrer, A. Ramos-Fernández, E. Camafeita, and E. Calvo, "Mass spectrometry technologies for proteomics," *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, vol. 4, no. 4, pp. 295–320, 2006, doi: 10.1093/bfgp/eli002.

- [29] R. Cramer, J. Gobom, and E. Nordhoff, “High-throughput proteomics using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry,” *Expert Review of Proteomics*, vol. 2, no. 3, pp. 407–420, 2005, doi: 10.1586/14789450.2.3.407.
- [30] R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams, and R. Beavis, “Mass determination of human immunoglobulin IgM using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry,” *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 8, no. 8, pp. 627–631, 1994, doi: 10.1002/rcm.1290080811.
- [31] I. Ferrer and E. M. Thurman, “Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 22, no. 10, pp. 750–756, 2003, doi: 10.1016/S0165-9936(03)01013-6.
- [32] A. El-Aneed, A. Cohen, and J. Banoub, *Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers*, vol. 44, no. 3. 2009.
- [33] D. R. Allen and B. C. McWhinney, “Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications,” *Clinical Biochemist Reviews*, vol. 40, no. 3, pp. 135–146, 2019, doi: 10.33176/AACB-19-00023.
- [34] L. Lin *et al.*, “Types, principle, and characteristics of tandem high-resolution mass spectrometry and its applications,” *RSC Advances*, vol. 5, no. 130, pp. 107623–107636, 2015, doi: 10.1039/c5ra22856e.
- [35] P. L. Urban, Y.-C. Chen, and Y.-S. Wang, “Mass Analyzers for Time-resolved Mass Spectrometry,” in *Time-Resolved Mass Spectrometry*, 2016, pp. 53–88.
- [36] S. Beck *et al.*, “The impact II, a very high-resolution quadrupole time-of-flight instrument (QTOF) for deep shotgun proteomics,” *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 14, no. 7, pp. 2014–2029, 2015, doi: 10.1074/mcp.M114.047407.
- [37] J.-A. L. Kelsey C. Martin Mhatre V. Ho, Ruben Martin and Stephen L. Buchwald, J.-A. L. Mhatre V. Ho and Kelsey C. Martin, C. Craik, A. Manuscript, and Kantrowitz, “基因的改变NIH Public Access,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1021/pr2001429.Simultaneous.
- [38] S. Eliuk and A. Makarov, “Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation,” *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 8, pp. 61–80, 2015,

doi: 10.1146/annurev-anchem-071114-040325.

- [39] E. S. Hecht, M. Scigelova, S. Eliuk, and A. Makarov, *Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry*. 2019.
- [40] R. A. Zubarev and A. Makarov, “Orbitrap mass spectrometry,” *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 11. pp. 5288–5296, 2013, doi: 10.1021/ac4001223.
- [41] A. Michalski *et al.*, “Mass spectrometry-based proteomics using Q exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer,” *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 10, no. 9, p. M111.011015, 2011, doi: 10.1074/mcp.M111.011015.
- [42] M. Hardman and A. A. Makarov, “Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source,” *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 7, pp. 1699–1705, 2003, doi: 10.1021/ac0258047.
- [43] J. V. Olsen *et al.*, “Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap,” *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 4, no. 12, pp. 2010–2021, 2005, doi: 10.1074/mcp.T500030-MCP200.
- [44] J. Y. Lee *et al.*, “Characterization of Site-Specific N-Glycopeptide Isoforms of α -1-Acid Glycoprotein from an Interlaboratory Study Using LC-MS/MS,” *Journal of Proteome Research*, vol. 15, no. 12, pp. 4146–4164, 2016, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b01159.
- [45] D. Virág *et al.*, “Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications,” *Chromatographia*, vol. 83, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1007/s10337-019-03796-9.
- [46] A. L. Santos and A. B. Lindner, “Protein Posttranslational Modifications: Roles in Aging and Age-Related Disease,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/5716409.
- [47] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, and S. Brunak, “Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence,” *Proteomics*, vol. 4, no. 6, pp. 1633–1649, 2004, doi: 10.1002/pmic.200300771.
- [48] D. Ribet and P. Cossart, “Pathogen-mediated posttranslational modifications: A

- re-emerging field,” *Cell*, vol. 143, no. 5, pp. 694–702, 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.11.019.
- [49] R. Goulabchand, T. Vincent, F. Batteux, J. François Eliaou, and P. Guilpain, “Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases,” *Autoimmunity Reviews*, vol. 13, no. 7, pp. 742–750, 2014, doi: 10.1016/j.autrev.2014.02.005.
- [50] A. Dell and H. R. Morris, “Glycoprotein structure determination by mass spectrometry,” *Science*, vol. 291, no. 5512, pp. 2351–2356, 2001, doi: 10.1126/science.1058890.
- [51] W. R. Alley, B. F. Mann, and M. V. Novotny, “High-sensitivity Analytical Approaches for the Structural Characterization of Glycoproteins,” 2013.
- [52] A. Kirwan, M. Utratna, M. E. O. Dwyer, L. Joshi, and M. Kilcoyne, “Glycosylation-Based Serum Biomarkers for Cancer Diagnostics and Prognostics,” vol. 2015, 2015.
- [53] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, and R. A. Dwek, “Glycosylation and the immune system,” *Science*, vol. 291, no. 5512, pp. 2370–2376, 2001, doi: 10.1126/science.291.5512.2370.
- [54] Z. Zhu and H. Desaire, “Carbohydrates on Proteins: Site-Specific Glycosylation Analysis by Mass Spectrometry,” *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 8, pp. 463–483, 2015, doi: 10.1146/annurev-anchem-071114-040240.
- [55] M. J. Huddleston, M. F. Bean, S. A. Carr, S. B. Pharmaceuticals, P. Box, and K. Prussia, “Collisional Fragmentation of Glycopeptides by Electrospray Ionization LC / MS and LC / MS / MS : Methods for Selective Detection of Glycopeptides in Protein Digests,” no. 11, pp. 877–884, 1993.
- [56] W. St and B. Ii, “Glycoproteins : Theoretical Considerations,” vol. 32, no. 1, pp. 3–13, 2013, doi: 10.1002/elps.201000393.Recent.
- [57] D. S. Dalpathado and H. Desaire, “Glycopeptide analysis by mass spectrometry,” *Analyst*, vol. 133, no. 6, pp. 731–738, 2008, doi: 10.1039/b713816d.
- [58] H. Desaire, “Glycopeptide analysis, recent developments and applications,” *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 12, no. 4, pp. 893–901, 2013, doi: 10.1074/mcp.R112.026567.

- [59] M. P. Baković *et al.*, “High-throughput IgG Fc N-glycosylation profiling by mass spectrometry of glycopeptides,” *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 2, pp. 821–831, 2013, doi: 10.1021/pr300887z.
- [60] P. Suder, “Tandem Mass Spectrometry,” Poland, 2019, pp. 231–235.
- [61] H. Liu, N. Zhang, D. Wan, M. Cui, Z. Liu, and S. Liu, “Mass spectrometry-based analysis of glycoproteins and its clinical applications in cancer biomarker discovery,” *Clinical Proteomics*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1186/1559-0275-11-14.
- [62] A. W. Jones and H. J. Cooper, “MINIREVIEW Dissociation techniques in mass spectrometry-based proteomics †,” pp. 3419–3429, 2011, doi: 10.1039/c0an01011a.
- [63] L. Sleno and D. A. Volmer, “SPECIAL FEATURE : Ion activation methods for tandem mass spectrometry,” pp. 1091–1112, 2004, doi: 10.1002/jms.703.
- [64] A. Shajahan, C. Heiss, M. Ishihara, and P. Azadi, “Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins—a tutorial,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 409, no. 19, pp. 4483–4505, 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0406-7.
- [65] I. Perdivara, R. Petrovich, B. Alliquant, L. J. Deterding, K. B. Tomer, and M. Przybylski, “Elucidation of O-glycosylation structures of the β -amyloid precursor protein by liquid chromatography-mass spectrometry using electron transfer dissociation and collision induced dissociation,” *Journal of Proteome Research*, vol. 8, no. 2, pp. 631–642, 2009, doi: 10.1021/pr800758g.
- [66] J. Zaia, “Mass spectrometry of oligosaccharides,” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 23, no. 3, pp. 161–227, 2004, doi: 10.1002/mas.10073.
- [67] N. Leymarie and J. Zaia, “Effective use of mass spectrometry for glycan and glycopeptide structural analysis,” *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 7, pp. 3040–3048, 2012, doi: 10.1021/ac3000573.
- [68] D. Wang, M. Hincapie, T. Rejtar, and B. L. Karger, “Ultrasensitive characterization of site-specific glycosylation of affinity-purified haptoglobin from lung cancer patient plasma using 10 μ m i.d. porous layer open tubular liquid chromatography-linear ion trap collision-induced dissociation/electron transf,” *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 6, pp. 2029–2037, 2011, doi:

10.1021/ac102825g.

- [69] P. Pompach, K. B. Chandler, R. Lan, N. Edwards, and R. Goldman, “Semi-automated identification of N-glycopeptides by hydrophilic interaction chromatography, nano-reverse-phase LC-MS/MS, and glycan database search,” *Journal of Proteome Research*, vol. 11, no. 3, pp. 1728–1740, 2012, doi: 10.1021/pr201183w.
- [70] K. Sandra, B. Devreese, J. Van Beeumen, I. Stals, and M. Claeysens, “The Q-Trap mass spectrometer, a novel tool in the study of protein glycosylation,” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 15, no. 3, pp. 413–423, 2004, doi: 10.1016/j.jasms.2003.11.003.
- [71] P. Suder, “Tandem mass spectrometry,” in *Mass Spectrometry: An Applied Approach*, 2019, pp. 231–259.
- [72] S. A. Robotham, A. P. Horton, J. R. Cannon, V. C. Cotham, E. M. Marcotte, and J. S. Brodbelt, “UVnovo: A de Novo Sequencing Algorithm Using Single Series of Fragment Ions via Chromophore Tagging and 351 nm Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry,” *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 7, pp. 3990–3997, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b00261.
- [73] J. Jebanathirajah, H. Steen, and P. Roepstorff, “Using Optimized Collision Energies and High Resolution, High Accuracy Fragment Ion Selection to Improve Glycopeptide Detection by Precursor Ion Scanning,” vol. 0305, no. 03, 2003, doi: 10.1016/S1044-0305(03)00263-0.
- [74] J. V. Olsen, B. Macek, O. Lange, A. Makarov, S. Horning, and M. Mann, “Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis,” *Nature Methods*, vol. 4, no. 9, pp. 709–712, 2007, doi: 10.1038/nmeth1060.
- [75] E. D. Dodds, “GAS-PHASE DISSOCIATION OF GLYCOSYLATED PEPTIDE IONS,” no. August 2011, 2012, doi: 10.1002/mas.
- [76] H. Yang, “Characterization of glycopeptides using a stepped higher - energy C - trap dissociation approach on a hybrid quadrupole orbitrap,” no. February, pp. 1353–1362, 2018, doi: 10.1002/rcm.8191.
- [77] A. Westman-Brinkmalm and G. Brinkmalm, “Tandem Mass Spectrometry,” in *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, 2008, pp.

89–103.

- [78] H. J. Cooper, K. Håkansson, and A. G. Marshall, “The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis,” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 24, no. 2, pp. 201–222, 2005, doi: 10.1002/mas.20014.
- [79] L. Fornelli, A. W. Schmid, L. Grasso, H. Vogel, and Y. O. Tsybin, “Deamidation and transamidation of substance p by tissue transglutaminase revealed by electron-capture dissociation fourier transform mass spectrometry,” *Chemistry - A European Journal*, vol. 17, no. 2, pp. 486–497, 2011, doi: 10.1002/chem.201002483.
- [80] A. Halim, U. Rüetschi, G. Larson, and J. Nilsson, “LC-MS/MS characterization of O-glycosylation sites and glycan structures of human cerebrospinal fluid glycoproteins,” *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 2, pp. 573–584, 2013, doi: 10.1021/pr300963h.
- [81] F. Q. Instruments *et al.*, “The Art of Destruction : Optimizing Collision Energies,” *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2015, doi: 10.1007/s13361-015-1308-6.
- [82] Z. Lin *et al.*, “Mass spectrometric assay for analysis of haptoglobin fucosylation in pancreatic cancer,” *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no. 5, pp. 2602–2611, 2011, doi: 10.1021/pr200102h.
- [83] M. J. Oh, S. H. Lee, U. Kim, and H. J. An, “In-depth investigation of altered glycosylation in human haptoglobin associated cancer by mass spectrometry,” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 42, no. 2, pp. 496–518, 2023, doi: 10.1002/mas.21707.
- [84] G. van Schaick, M. Wührer, and E. Domínguez-Vega, “Dopant-enriched nitrogen gas to boost ionization of glycoproteins analyzed with native liquid chromatography coupled to nano-electrospray ionization,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1265, no. May, p. 341271, 2023, doi: 10.1016/j.aca.2023.341271.
- [85] W. Cao, M. Liu, S. Kong, M. Wu, and Y. Zhang, “Special Issue : Glycoproteomics Recent Advances in Software Tools for More Generic and Precise Intact Glycopeptide Analysis Special Issue: Glycoproteomics Recent Advances in Software Tools for More Generic and Precise Intact Glycopeptide Analysis,” *Mol*

Cell Proteomics, vol. 20, p. 100060, 2021, doi: 10.1074/mcp.R120.002090.

- [86] I. Marginean, K. Tang, R. D. Smith, and R. T. Kelly, “Picoelectrospray Ionization Mass Spectrometry Using Narrow-Bore Chemically Etched Emitters,” pp. 30–36, 2014, doi: 10.1007/s13361-013-0749-z.
- [87] I. Marginean, R. T. Kelly, D. C. Prior, B. L. Lamarche, K. Tang, and R. D. Smith, “Analytical Characterization of the Electrospray Ion Source in the Nanoflow Regime,” vol. 80, no. 17, pp. 6573–6579, 2008.

