

**KÜTLE SPEKTROMETRİSİ
UYGULAMALARINDA FOSFOPEPTİTLERİN
HASSAS TAYİNİ İÇİN YENİ STRATEJİLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF NEW STRATEGIES FOR
SENSITIVE DETECTION OF PHOSHOPEPTIDES IN
MASS SPECTROMETRY APPLICATIONS**

ESİN YILMAZ

DOÇ. DR. ÖMÜR ÇELİKBIÇAK
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2018

Esin YILMAZ'ın hazırladığı “Kütle Spektrometrisi Uygulamalarında Fosfopeptitlerin Hassas Tayini İçin Yeni Stratejilerin Geliştirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Lokman UZUN
Başkan



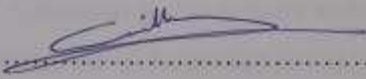
Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK
Danışman



Doç. Dr. Gökhan DEMİREL
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Cengiz UZUN
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Eda ÇELİK AKDUR
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 03.08.2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

04/07/2018



Esin YILMAZ

ETİK

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

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

beyan ederim.

04/07/2018



Esin YILMAZ

ÖZET

KÜTLE SPEKTROMETRİSİ UYGULAMALARINDA FOSFOPEPTİTLERİN HASSAS TAYİNİ İÇİN YENİ STRATEJİLERİN GELİŞTİRİLMESİ

ESİN YILMAZ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. ÖMÜR ÇELİKBIÇAK

Haziran 2018, 123 sayfa

Proteinlerin çoğu belli bir zamanda, belli bir fonksiyonu yerine getirirken serin, treonin veya tirozin aminoasitleri üzerinden fosfatlanmış olabilirler. Yapısında fosfat grubu bulunduran proteinlere fosfoprotein; fosfat grubunun bulunduğu daha küçük aminoasit dizilerine fosfopeptit denilmektedir. Hayati önem taşıyan birçok biyolojik fonksiyon, proteinlerin fosforolizasyonu ve defosforilizasyonu gibi post translasyonel modifikasyonlar (post translational modifications, PTMs) ile açıklanabilmektedir. Serin (Ser), treonin (Thr) ve tirozin (Tyr) aminoasitlerinin hidroksil gruplarında meydana gelen bu modifikasyonlar esnasında, kinaz enzimleri aminoasitlere fosfat grupları bağlarken, fosfataz enzimleri ise fosfat gruplarını kesmektedir. Birçok post-translasyonel modifikasyonun hücrel aktivite, tepki verme ve gelişim mekanizmalarındaki rolleri, hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu yüzden post-translasyonel modifikasyonları incelemek ve mekanizmalarını aydınlatmak önemlidir.

Bu tez kapsamında, insan vücudunda bulunan demir ve kalsiyumun kullanım oranını arttırırken, yağ asitlerinin yıkımını engelleyen fosfopeptitlere karşı ilgi (afinite) gösterdiği bilinen organik ve/veya anorganik moleküller içeren malzemeler üretilerek, fosfopeptitlerin zenginleştirilmesi sağlanmış ve sonrasında ESI (electrospray ionization) kütle spektrometrisi yöntemi ile etkin bir şekilde incelenmiştir. Sol-jel malzemeler ağırlıklı olarak $C_6H_6MgO_7$ (Magnezyum sitrat) tuzu ile TEOS (tetraetilortosilikat) kimyasal bileşenleri kullanarak

sentezlenmiştir. Magnezyum elementi metabolizma içerisinde en fazla bulunan dördüncü mineral olarak, vücut içerisinde 300 farklı tepkimede rol oynamaktadır. Protein sentezi gibi faaliyetlerdeki görevlerine ek olarak Pearson'ın sert-yumuşak asit ve bazlar teorisine göre sert bir asit olan Mg^{2+} katyonunun, sert bir baz olan PO_4^- anyonuyla daha kuvvetli etkileşime girmesi beklenmektedir. Bu nedenle magnezyum iyonu içeren farklı tipte sol-jel malzemeler sentezlenmiştir. Üretilen malzemelerden H_3PO_4 (fosforik asit) katılarak sentezlenen $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jelinin fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında en yüksek performansı gösterdiği görülmüştür. ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared) spektroskopisi ve TGA (Thermo Gravimetric Analysis) ile gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jel yapısının diğer sol-jel yapılarına göre daha çok su barındırdığı ve bu sayede çözeltideki fosfopeptitlerin sol-jel yapısına difüzyonunu hızlandırarak adsorpsiyon kapasitesini artırdığı anlaşılmıştır. Bu sayede 13 pmol/mL (13 fmol/ μ L) derişime sahip fosfopeptitler başarılı bir şekilde zenginleştirilmiştir. Sol-jel malzemelerin yüzeylerinde XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) ile gerçekleştirilen analizlerde, sentez esnasında malzemeye eklenen kimyasallardan TEOS (tetraetilortosilikat) ve fosforik asit ile fosfopeptitlerin başarılı bir şekilde zenginleştirilmesinde etkili olan $C_6H_6MgO_7$ maddelerinin yapıda bulundukları gözlenmiştir. Zenginleştirme çalışmaları sonucunda elde edilen ESI kütle spektrumları açık kaynak kodlu mMass yazılımı (www.mmass.org) kullanılarak incelenmiş, fosfopeptit yakalama oranları matematiksel ve bilimsel olarak ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Fosfopeptit, Magnezyum, ESI, Kütle Spektrometrisi, Post Translasyonel Modifikasyon, Zenginleştirme

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NEW STRATEGIES FOR SENSITIVE DETECTION OF PHOSPHOPEPTIDE IN MASS SPECTROMETRY APPLICATIONS

Esin YILMAZ

Master of Science, Division of Bioengineering

Supervisor: Doç. Dr. ÖMÜR ÇELİKBIÇAK

June 2018, 123 pages

Most of the proteins may at some time be phosphorylated on serine, threonine or tyrosine aminoacids when they perform a certain function. Phosphoprotein is protein that contain phosphate group in structure. The smaller amino acid sequences found in the phosphate group are called phosphopeptides. Many vital biological functions can be explained by post translational modifications (PTMs), such as phosphorylation and dephosphorylation of proteins. During these modifications that occur in the hydroxyl groups of serine (Ser), threonine (Thr) and tyrosine (Tyr) amino acids, kinase enzymes bind phosphate groups to amino acids while phosphatase enzymes block phosphate groups. The role of many post-translational modifications in cellular activity, response, and development mechanisms remains unclear. Therefore, it is important to examine post-translational modifications and clarify their mechanisms.

In this thesis, phosphopeptides in peptide mixtures are enriched by sol-gels which are containing cationic moieties, expected to show affinity for phosphopeptides. Sol-gel materials were synthesized predominantly by using $C_6H_6MgO_7$ (Magnesium citrate) salt and TEOS (tetraethylorthosilicate) chemical components. Magnesium is the fourth most abundant mineral in metabolism and plays a role in 300 different reactions within the metabolism. In addition to its role in activities such as protein synthesis, the Mg^{2+} cation, which is a hard acid according to Pearson's hard-soft acid and bases theory is expected to interact more strongly with a hard base, PO_4^- anion. For this reason, different types of sol-gel materials which containing magnesium ions were synthesized. The $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-gel, which was synthesized using H_3PO_4 (phosphoric acid) showed the highest performance in phosphopeptide enrichment studies. In the characterization studies

carried out by ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared) spectroscopy and TGA (Thermo Gravimetric Analysis), The $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-gel structure contained more water than the other sol-gel structures and increased adsorption capacity of phosphopeptides by accelerating the diffusion rate into the sol-gel structure. Thus, the phosphopeptides at a concentration of 13 pmol/mL (13 fmol/ μ L) were successfully enriched from the solution. The surfaces of the sol-gel materials analyzed by XPS (X-Ray Photoelectron spectroscopy) technique and it was observed that TEOS (tetraethylorthosilicate), and Magnesium, which is effective for the successful enrichment of phosphopeptides, embedded into the structure. ESI mass spectra, obtained after the phosphopeptide enrichment studies, were investigated by open-source mMass software (www.mmass.org), and phosphopeptide enrichment rates were mathematically and scientifically demonstrated.

Keywords: Phosphopeptides, Magnesium, ESI, Mass Spectrometry, Post Translational Modification, Enrichment

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisinden faydalandığım hocam, Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK’a,

Tez kapsamında kullanmış olduğum malzemelerin sentezindeki katkılarından dolayı hocam Yrd. Doç. Dr. Cengiz UZUN’a

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım iş arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarımnda cihaz ve alt yapısından faydalandığım Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, HÜNİTEK’e,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme,

Her zaman yanımda olup, pes ettiğim zamanlarda beni yeniden cesaretlendiren Yunus Emre’ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Proteom Analizi.....	5
2.2. Post Translasyonel Modifikasyon (PTM).....	6
2.3. Protein Fosforilasyonu.....	7
2.4. Fosfopeptitlerin Seçimli Olarak Zenginleştirilmesi	8
2.5. Kütle Spektrometrisi.....	9
2.5.1. İyon Kaynakları	10
2.5.1.1. Gaz Faz Analitlerin İyonlaştırma Teknikleri.....	12
2.5.1.2. Katı Faz Analitlerin İyonlaştırma Teknikleri	13
2.5.1.3. Sıvı Faz Analitlerin İyonlaştırma Teknikleri.....	15
2.5.2. Kütle Ayırıcılar.....	16
2.5.3. Fosfopeptitlerin Kütle Spektrometrisi ile Analizi	17
3. DENEYSEL BİLGİLER	19
3.1. Kimyasallar.....	19
3.2. Sol-Jel Malzemelerin Sentezi	19
3.3. Sol-Jellerin Karakterizasyon Çalışmaları	20
3.3.1. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spektroskopisi.....	20

3.3.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)	20
3.3.3. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS).....	21
3.4. Proteinlerin Tripsin Enzimi ile Parçalanması	21
3.5. Fosfopeptitlerin Sentezlenen Sol-Jel Malzemeler ile Zenginleştirilmesi	22
3.5.3. Fosfopeptitlerin ESI Kütle Spektrometrisi ile Tayini.....	23
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	24
4.3. Sol-Jel Malzemelerin Karakterizasyonu.....	25
4.3.3. Sol-Jel Malzemelerin ATR-FTIR Spektrometrisi ile İncelenmesi	25
4.3.4. Sol-Jel Malzemelerin Termogravimetrik Analizleri.....	31
4.3.5. Sol Jel Malzemelerin XPS ile İncelenmesi.....	38
4.4. Sol-Jel Malzemelerle Fosfopeptitlerin Zenginleştirilmesi	40
4.2.1 Sol-Jel Malzemelerle β -Kazein Peptitlerinin Zenginleştirilmesi.....	43
4.2.2. Sol-Jel Malzemelerle β - Kazein ve BSA Peptit Karışımlarının Zenginleştirilmesi ..	58
5. SONUÇLAR.....	74
6. KAYNAKÇA	76
7. EKLER.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kütle Spektrometri Sistemi.....	10
Şekil 2.2. ESI iyonlaşmanın Basit Gösterimi.....	16
Şekil 2.3. Proteomik Bir Çalışmada Fosfopeptitlerin ESI-MS Analizleri.....	17
Şekil 4.1. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ @TEOS (3B kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.....	25
Şekil 4.2. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ @TEOS (3C kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.....	26
Şekil 4.3. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl@TEOS (3D kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.....	27
Şekil 4.4. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.....	28
Şekil 4.5. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ -PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.....	29
Şekil 4.6. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.....	30
Şekil 4.7. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ @TEOS (3B kodlu sol-jel) Termogramı.....	31
Şekil 4.8. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ @TEOS (3C kodlu sol-jel) Termogramı.....	32
Şekil 4.9. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl@TEOS (3D kodlu sol-jel) Termogramı.....	33
Şekil 4.10. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) Termogramı.	34
Şekil 4.11. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ -PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel)Termogramı.	35
Şekil 4.12. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) Termogramı.....	36
Şekil 4.13. Tüm Örneklerin Karşılaştırmalı Termogram Sonuçları.....	37
Şekil 4.14.Sol-jel malzemenin XPS spektrumu.....	38
Şekil 4.15. Tripsin ile Parçalanmış β-kazein'in ESI Kütle Spektrumu.....	40
Şekil 4.16. Tripsin ile Parçalanmış β-kazein'e ait kütle spektrumunun mMass yazılımında görüntülenmesi.....	41
Şekil 4.17. B-Kazein'in Uniprot Veritabanından Elde Edilmiş Amino Asit Dizilimi.....	42
Şekil 4.18. ESI-MS ile deneysel olarak ölçülen β-kazein peptitlerine ait m/z değerlerinin, β-kazein proteinine ait teorik parçalama sonucu elde edilmiş peptit m/z değerleriyle karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.19. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ @TEOS (3B kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	45
Şekil 4.20. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ @TEOS (3C kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	48
Şekil 4.21 C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl@TEOS (3D kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	51

Şekil 4.22. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	53
Şekil 4.23. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ -PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	55
Şekil 4.24. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -PEG@TEOS (3J kodlu Sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	57
Şekil 4.25. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ @TEOS (3B kodlu Sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	59
Şekil 4.26. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ @TEOS (3C kodlu Sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	61
Şekil 4.27. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl@TEOS (3D kodlu sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	63
Şekil 4.28. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	66
Şekil 4.29. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ -PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	68
Şekil 4.30. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.....	69
Şekil 4.31. Sol-jellerin Fosfopeptit Zenginleştirme Oranları.....	70
Şekil 4.32. Süt proteinlerine ait peptit karışımının C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ @TEOS (3B kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmesi sonucu elde edilen ESI kütle spektrumu.....	72

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Pearson'ın Sert-Yumuşak Asit-Baz.....	4
Tablo 2.1 Bazı Post Translasyonel Modifikasyon Çeşitleri.....	7
Tablo 2.2. İyonlaşma Modelleri.....	11
Tablo 3.1. C ₆ H ₆ MgO ₇ İçeren Sol-Jellerin Kimyasal Oranları.....	20
Tablo 4.1. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ @TEOS (3B kodlu sol-jel) için Pik Tablosu.....	39
Tablo 4.2. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ @TEOS (3B kodlu sol-jel) İçin β-Kazein Eşleşme Listesi.....	45
Tablo 4.3. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ @TEOS (3C kodlu sol-jel) İçin β -Kazein Eşleşme Listesi...	48
Tablo 4.4. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl@TEOS (3D kodlu sol-jel) İçin Fosfopeptit Eşleşme Listesi...	51
Tablo 4.5. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) İçin β –Kazein Eşleşme Listesi.....	53
Tablo 4.6. C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ -PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) İçin β –Kazein Eşleşme Listesi.....	56
Tablo 4.7. C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) İçin β –Kazein Eşleşme Listesi.....	58
Tablo 4.8. β-Kazein/BSA karışımının C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.....	60
Tablo 4.9. β-Kazein/BSA karışımının C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ @TEOS (3C kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.....	62
Tablo 4.10. β-Kazein/BSA karışımının C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl@TEOS (3D kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.....	63
Tablo 4.11. β-Kazein/BSA karışımının C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.....	66
Tablo 4.12. β-Kazein/BSA karışımının C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ -PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.....	68
Tablo 4.13. β-Kazein/BSA karışımının C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.....	69
Tablo 4.14. Süt'ün C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -@TEOS (3B kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.....	72

SİMGELELER ve KISALTMALAR

Simgeler

μL	Mikrolitre
β	Beta
α	Alfa
κ	Kappa
Da	Dalton
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
mg	milligram
mM	milimolar
g	gram

Kısaltmalar

A	Adenin
ACN	Aseto Nitril
BSA	Sığır Serum Albümin
$\text{C}_6\text{H}_6\text{MgO}_7$	Magnezyum Sitrat
C	Sitozin
CI	Kimyasal İyonlaşma
CID	Çarpışma ile Oluşturulmuş Parçalanma
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	1,4-Dithiotreitol
EI	Elektron Bombardımanı
ESI	Elektro Sprey İyonlaşma
FAB	Hızlı Atom Bombardımanı
FT-IR	Fourier Dönüşümlü İnfrared
G	Guanin
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IAA	İyodoasetamit
IMAC	İmmobilize Edilmiş Metal İyon Afinitesi Kromatografisi
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonlaştırma
MS	Kütle Spektrometrisi

m/z	Kütle-Yük Oranı
XPS	X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi
pSer	Fosfoserin
pThr	Fosfotreonin
PTM	Post Translayonel Modifikasyon
pTyr	Fosfotirozin
Q	Dört Kutuplu
RNA	Ribonükleik Asit
Ser	Serin
T	Timin
TGA	Termal Gravimetrik Analiz
TFA	Trifloroasetik Asit
Thr	Treonin
Tyr	Tirozin
TOF	Uçuş Zamanı

1. GİRİŞ

Adenin (A), timin (T), guanin (G) ve sitozin (C) bazlarından oluşan ve bir organizmanın kalıtsal şifresini oluşturan genetik yapıya *genom* adı verilir [1]. *Proteom* terimi, protein ve genom kelimelerinden türetilmiş olup, proteinlerin modifikasyon durumları, konformasyonları, birbirleri ile etkileşimleri, nitelik ve nicelikleri ile ilgili oldukça dinamik olan bir süreçte genomların protein karşılığı olarak tanımlanabilir [2]. Canlı organizmaların karmaşıklığı, kompleks olan genlerden daha da kompleks olan proteomlardan kaynaklanmaktadır. Genomu yalnızca dört harfin kullanıldığı (A, T, G, C) ve üç harfli kelimelerle yazılmış bir kitap olarak düşünersek, 23 kromozomu da tek tek birer bölüm olarak tanımlarsak her bir bölüm içinde yaklaşık 40.000 hikaye, yani gen bulunur. Normal faaliyetlerine devam eden ya da değişime uğramış hücre fonksiyonlarının tanımlanması, hastalık-hedef organ ilişkisi, ilaç toksisite analizi gibi pek çok biyolojik problemin açıklanabilmesinde proteomik son derece önemli bir rol oynar [3, 4]. Nükleotitlerden elde edilen bilginin genellikle son ürünü olan proteinler, doğrusal ya da dairesel formlarda bulunabilen ve son derece esnek olabilen 300 ila 10000 aminoasitin kombinasyonundan oluşmuş zincirlerdir [5]. İnsan vücudunda ortalama 75 trilyon hücre vardır [6]. Normal bir hücrede binlerce farklı protein bulunur ve bu proteinler hücrenin ihtiyaçlarına göre sentezlenerek uygun hücresel hedeflere yönlendirilirler. Proteinler, yaşamsal faaliyetlerin oluşumunda ve düzenlenmesinde vazgeçilmez öneme sahiptirler. Bu nedenle bu faaliyetlerin mekanizmalarının anlaşılabilmesi için öncelikle proteinlerin yapılarının ve işleyişlerinin aydınlatılması gerekmektedir. Sitoplazmada bulunan ribozomun ya da endoplazmik retikulumun, hücre çekirdeğindeki DNA'yı RNA'ya transkripsiyonu sonrasında protein sentezleme süreci olarak adlandırılan protein translasyonu bittiği sırada; proteinler, bir takım kimyasal değişikliklere uğrayarak metabolizma içerisinde yeni özellikler ve yeni görevler kazanmaları olarak bilinen ve post-translasyonel modifikasyon (PTM) olarak adlandırılan bir işleme uğrarlar [7]. Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde proteinler vasıtasıyla gerçekleşen önemli hücresel faaliyetlerin kontrolünde PTM'lerden faydalanılmaktadır. Bir proteinin, maruz kaldığı modifikasyon sayısı ve çeşidi fazla olabilmektedir. Ökaryotik hücrelerde sık karşılaşılan ve daha detaylı olarak çalışılmış PTM'lere fosforilasyon, glikozilasyon, asetilasyon, açılasyon, prenilasyon, metilasyon ve ubiquitinasyon örnek gösterilebilir [8]. Bu tip modifikasyonları gerçekleştiren enzimlerin sayısı binin üzerindedir. PTM'ye uğramış substratların iyi kavranması ve çalışılması, proteinlerin fonksiyonları ve

PTM'lerin hastalıklarla olan ilişkilerinin anlaşılması için oldukça önemlidir. Fosforilasyon (ve defosforilasyon), sinyal iletmeye kullanılan proteinlerin düzenlenmesi için sıklıkla kullanılan PTM çeşidi olup, hücre biyolojisi ve organizmanın tüm faaliyetlerini etkilemektedir [9]. Fosforilasyonun önemi için verilebilecek en iyi örnek, p53 tümör baskılayıcı proteindir. Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde p53 proteini fosforilasyon ile aktive edilmekte ve bu da apoptoz, DNA tamiri ve hücre yaşlanmasını kapsayan antiproliferatif bir etkiye neden olmaktadır. p53 proteinin etkinliği çeşitli mekanizmalarla düzenlenmekte ve 18 farklı fosforilasyon konumu bulunmaktadır [10]. Bu protein, defosforilasyon sonucu etkinliğini kaybeder; ancak ortamda bulunmaya devam eder. Bu olay birçok sinyal iletim mekanizmasında da görülmektedir.

Proteomik çalışmalarda konvansiyonel olarak yürütülen, protein tayini ve tanımlama çalışmalarında oldukça yüksek başarıya sahip olan kütle spektrometrisi, araştırmalar sonucu yeni keşfedilen çok sayıda biyolojik molekülün tanımlanması ve tayini için sürekli olarak yeni analitik metotlara ihtiyaç duymaktadır. Son yıllarda oldukça popüler hale gelen fosfoproteinlerin ve fosfopeptitlerin analizlerinde de benzer ihtiyaçlar söz konusudur. Bu tür analizlerde, doğal biyolojik örnekler içerisinde yer alan protein havuzunun çeşitliliği düşünüldüğünde, kütle spektrometrik analizler esnasında ve sonrasında verileri yorumlarken ortaya çıkan karmaşayı azaltmak amacıyla zenginleştirme gibi bir takım ön analitik uygulamalara ihtiyaç duyulabilmektedir. Post translasyonel modifikasyona (asetilasyon, alkilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon, glikozilasyon vb.) uğramış tüm proteinler için de benzer durum geçerlidir. Zaten çok düşük hacim ve boyutlarda olan bazı doğal örnekler (doku, hücre lizati, gözyaşı vb.) içerisindeki modifiye proteinlerin derişimlerinin ve iyonlaşma verimlerinin de oldukça düşük olduğu düşünüldüğünde gerçekleştirilecek olan analizlerin zorluğu daha rahat anlaşılabilir. Fosfopeptitlerin zenginleştirilmeleri ve kütle spektrometrik analizleriyle ilgili, yüksek etki faktörlü dergilerde yayınlanmış makalelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde başarılı çalışmaların mevcut olduğu ancak biyolojik protein havuzundaki genişlik ve bilinmezlikler düşünüldüğünde, adeta samanlıkta iğne bulmayı daha kolay hale getirecek, yenilikçi bir takım yöntemlere olan ihtiyacın halen devam ettiği görülmektedir.

1980'li yılların ortalarında özellikle elektrosprey iyonlaştırma (Electrospray Ionization, ESI) ve matriks-yardımlı lazer desorpiyon/iyonlaştırma (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) gibi yeni iyonlaştırma yöntemlerinin geliştirilmesiyle; protein, peptit, DNA, RNA, sentetik polimerler, büyük organik ve inorganik kompleksler

gibi makromoleküllerin analizleri kütle spektrometrik olarak yapılabilir hale gelmiştir [11]. Bu gelişmeler ışığında, özellikle proteomik ve genomik gibi “omik” çalışma alanlarında önemli aşamalar kaydedilmiş ve bu çalışmalar için kütle spektrometrisi vazgeçilmez bir hale gelmiştir. Bu tür çalışmalarda, analiz edilecek moleküllerin iyonlaşma verimi ve diğer özelliklerine bağlı olarak analiz parametrelerinin belirlenerek optimize edilmesi çok önemlidir. Oldukça hassas bir analiz yöntemi olan MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry ve ESI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry) gibi yöntemlerle femtomol veya attomol seviyelerinde rahatlıkla tayin yapılabilmesine rağmen, fosfopeptitlerin miktarları tayin sınırlarının altında kalabilmektedir. Bunun en önemli sebebi olarak, özellikle doğal örneklerle çalışılırken ortamda bulunan diğer protein ve peptitlerin sinyalleri arasında fosfopeptit sinyallerinin kolay gözlenememesi veya fosfopeptitlerin iyonlaşma verimlerinin diğer peptitlerden daha düşük olması olarak ifade edilebilir. Diğer peptitlerle kıyaslandığında, fosfopeptitlerin fosfat grubuna bağlı olarak toplamda daha negatif yükler içermesi de tek bir analiz ortamında fosfopeptitlerin kolay gözlenememesinin ana sebeplerinden birisidir. Bu tür sorunların önüne geçmek için; analiz öncesinde fosfopeptitlerin bulundukları ortamlardan seçimli olarak ayrılarak zenginleştirilmeleri uygulanabilecek yöntemlerden bir tanesidir. Bunun için de immobilize metal afinite kromatografisi [12], katyon-değişim kromatografisi [13], peptit immün çöktürme [14] gibi farklı uygulamalardan yararlanılmaktadır. Seçimli olarak zenginleştirilen bu fosfopeptitler, daha sonra MS ve MS/MS (tandem mass spectrometry) teknikleriyle kolay bir şekilde tayin edilebilmektedir. Kütle spektrometrisi ile protein ve peptitler için tanımlama ve dizi analizi (protein sequencing) yapılabilmesinin yanı sıra, protein ve peptitlerin yer aldığı kovalent olmayan kompleksler de (noncovalent complexes) kolaylıkla incelenebilmektedir.

Bu tez kapsamında, beta kazein (β -kazein) proteinin tripsin enzimiyle parçalanması sonucu elde edilen peptit karışımı içerisinde yer alan düşük miktardaki fosfopeptitlerin, yine tez kapsamında sentezlenen $C_6H_6MgO_7$ -TEOS katyonik sol-jeller peptit karışımlarıyla adsorpsiyon-desorpsiyon basamakları eşliğinde muamele edilerek zenginleştirilmeleri sağlanmıştır. Magnezyum iyonu içeren tuz yapısı, Pearson’ın sert-yumuşak asit ve baz teorisine göre (Tablo 1.1) magnezyum katyonunun, fosfat anyonuyla en kuvvetli etkileşebilecek nitelikte olması nedeniyle tercih edilmiştir. Sol-jellerin sentezi esnasında polietilenglikol (PEG) gibi malzemeler eklenerek malzemenin hidrofilik özelliğinin ve gözenekliliğinin artırılması hedeflenmiştir. Üretilen sol-jellerin fosfopeptit zenginleştirme

performansları ESI-MS tekniği ile incelenmiştir. Sıcaklık, pH, adsorbsiyon ve desorpsiyon süreleri gibi en uygun ortam koşulları belirlendikten sonra yapılan zenginleştirme çalışmaları sonrasında, sentezlenen en iyi malzemenin fosfopeptit tutma kapasitesi 13 fmol/ μ L olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalar sayesinde hem fosfopeptit zenginleştirme amacıyla kullanılabilecek yeni bir malzeme geliştirilirken aynı zamanda ESI-MS tekniğiyle analizlerde kullanılabilecek parametreler ve analiz metodu da geliştirilmiştir. Elde edilen kütle spektrometrik veriler, açık kaynak kodlu mMass yazılımı (www.mmass.org) [15-17] kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmiş, UniProt (www.uniprot.org) veri tabanından elde edilen amino asit dizilerinden faydalanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda en yüksek performansa sahip sol-jel malzeme türleri belirlenerek, gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarıyla bu sonuçların nedenleri ortaya konulmuştur. Karakterizasyon çalışmalarında ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared) spektroskopisi, Termogravimetrik analiz (TGA) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) tekniklerinden faydalanılmıştır. Çalışmalar sonucunda, hücrel döngüler içerisinde oldukça önemli görevleri olan ve kanser vb. ciddi hastalıklarla yakın ilişkide olduğu bilinen fosfopeptitlerin seçici, kolay ve hassas tayinlerine yönelik metot ve malzemeler geliştirilmiştir.

Tablo 1.1. Pearson'ın Sert-Yumuşak Asit-Baz Diyagramı [18].

Sert Asitler	Kararsız Asitler	Yumuşak Asitler
H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Be^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , BF_3 , BCl_3 , Zn^{2+} , Ru^{2+} , Os^{3+} , $B(OR)_3$, Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Co^{3+}		Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Hg^+ , Pt^{2+} , Br^{2+} , I^{2+}
Sert Bazlar	Kararsız Bazlar	Yumuşak Bazlar
F^- , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^- , CH_3COO^- , OH^- , H_2O	Br^- , NO_2^- , NO_3^- , N_2	H^- , I^- , H_2S , HS^- , $S_2O_3^{2-}$, CN^- , CO

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Proteom Analizi

Biyolojik bir sistemi daha iyi analiz etmek için genom, transkriptom ve proteom terimleri metabolom terimi adı altında birleşir [19]. Omik bilimlerin amacı, belirli bir biyolojik örnekte bulunan tüm genlerin ve bunların metabolitler, transkriptler gibi ürünlerinin daha iyi tanımlanmasıdır [20]. Protein analizleri yapısal karmaşıklıkları sebebi ile DNA analizine kıyasla son derece zordur. DNA; adenin(A), timin (T), guanin (G) ve sitozin (C) adı verilen temel bazlardan oluşurken proteinler yirmi farklı aminoasitin farklı kombinasyonları ile kondenzasyon sonucu sentezlenir [21]. Bu karmaşaya bir de post-translasyonel modifikasyonlar eklendiğinde analiz iyice güç hale gelmektedir. Literatüre 1995 yılında geçen proteom terimi, Marc Wilkins [22] tarafından önerilmiştir. Proteomların analizi “proteomik” olarak adlandırılır ve proteomik, genetik dizilerdeki bilgiyi, biyolojik süreçlerin yapısını ve işlevlerini şifreleyen deneysel bir yaklaşım olarak tanımlanabilir [11]. Proteomik çalışmalarda amaç, proteinden yola çıkarak geni üreten sorumlu gene ulaşmaktır. Genlerin birbirleriyle ve çevre ile etkileşimlerini kontrol eden aynı zamanda bir organizmanın yapısal fonksiyonlarını kodlayan genleri de tanımlayan bilim alanı “genomik” olarak isimlendirilir [2]. Genomik çalışma alanının konusu; DNA baz dizilerinin belirlenerek genetik haritaların çıkarılması ve gen ekspresyonunun genom düzeyinde incelenmesidir [23]. Bu incelemeleri yapmaktaki amaç; hastalıkların doğası ya da fizyolojik süreçleridir. Hücresel homeostazinin sürdürülebilmesi için gen kontrolü son derece önemlidir ve bu kontrolün büyük çoğunluğu transkripsiyon esnasında birden fazla aşamada gerçekleşmektedir.

Pek çok hastalık, transkripsiyon esnasında gen kontrolündeki hatalar sebebi ile ortaya çıkmaktadır [24]. Örneğin; birçok sistem tarafından kullanılan bir proteindeki mevcut gende meydana gelen bir mutasyon olarak bilinen pleiotropik etki transkripsiyon esnasında oluşmaktadır [25].

Genomik çalışma alanından farklı olarak proteomik çalışma alanının konusu; mRNA düzeyinde proteinlerin post translasyonel modifikasyonları hakkında bilgi sağlamak, kodlanmış proteinlerin aktivitelerini araştırmaktır [23]. Hücrelerde neler olup bittiğinin ayrıntılı bilgisini vermeleri açısından proteom analizi oldukça önemlidir [26].

Proteinleri tanımlamada kullanılan en önemli parametre proteinlerin ya da proteinlerin parçalanması sonucu meydana gelen peptitlerin kütle değerleridir. Kütle ne kadar hassas bir

biçimde ölçülürse protein hakkında edinilecek bilgi de o kadar artar. Kütle spektrometrisi; yüksek çözünürlüklü molekül ve iyon ayırma teknikleri, son derece düşük miktarlarda ve derişimlerde örneklerle analiz yapabilmesi, proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerinden ya da protein içindeki post translasyonel modifikasyon gibi karmaşalardan etkilenmemesi ve protein veritabanları ile bütünleşmesi nedeniyle mevcut proteom analizinde giderek artan bir rol oynamaktadır [27].

2.1. Proteinlerin Yapısal Analizleri

Moleküler biyoloji, genomun devamı olan proteomik'in temelini oluşturur. Proteinler genler gibi sabit olmayıp, yapısal anlamda karmaşık ve değışken olduklarından, proteomik çalışmak genomik çalışmalara göre daha zordur [28]. İnsandaki genom sayısı 40.000'den az iken bununla beraber, bu genomların kodladığı proteinlerin yaklaşık sayısı 120.000'dir [29]. Hücreler, dokular ve bireyler arasındaki çeşitliliğin sebebi de 20 çeşit amino asitin farklı şekillerde dizilimlerinden kaynaklıdır. Hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için DNA'larını bir çeşit proteine dönüştürmeleri gerekir. Aynı genden üretilen proteinler farklı olabileceği gibi büyük ölçüde özdeşirler. Protein tanımlama sistemleri yakın akrabalar arasındaki farklılıkları tanımlamak dışında çok sayıda bağımsız proteini de tanımlamada yardımcıdır [30]. Bu proteinleri de analiz etmek için elektroforez, kromatografi, protein parmak izi, enzime bağı bağışıklık testi (ELİSA), x-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR), kütle spektrometrisi (MS) ve protein array gibi farklı yöntemler mevcuttur [31]. Bu yöntemlerden kütle spektrometri, proteinlerin parçalanma ürünü olan peptitlerin analizlerinde en etkili olan yöntemdir. Bu analiz yönteminde proteinler doğrudan tanımlanmazlar, genelde özel bir proteaz olan tripsin enzimi ile peptitlerine parçalanarak analiz yapılır. Bu amaçla farklı kütle spektrometrik uygulamalarda başka proteaz enzimler de (örn: kimotripsin, LysC, LysN, AspN, GluC ve ArgC) kullanılabilmektedir [32]. Böylece bir proteini tanımlamada karşımıza çıkacak sorunlar peptidi tanımlamadaki sorunlara indirgenmiş olur [33].

2.2. Post Translasyonel Modifikasyon (PTM)

Protein sentezini başlatan (AUG) ve sonlandıran (UAA, UAG, UGA) kodonlara sahip olan ribozom üzerinde; mRNA, gerekli enerji, aminoasitler ve t-RNA ile gerçekleşen protein sentezi ile proteinler, sekonder ve tersiyer yapılarını hidrojen bağı, iyonik bağlar ve van der Waals bağları ile tamamladıktan sonra, yapılarındaki aminoasitleri modifiye etme ya da zincir kısalması gibi fonksiyonlarla değışiklik yaparlar ve yeni görevler edinirler [34]. Tüm

bu değişiklikler post translasyonel modifikasyon (PTM) olarak adlandırılır. Translasyon; transkripsiyonu (genetik bilgi aktarımı) da içeren protein sentezinin gerçekleşmesi için m-RNA'daki kodların deşifre edilmesi işlemidir [35]. Proteinin doğru bir şekilde sentezlenebilmesi için bu esnada pek çok enzim görev yapar. İnsan genomunun 20.000 ile 40.000 genden oluştuğu varsayılır. Ancak toplam protein sayımızın bir milyonun üzerinde olması pek çok proteinin tek bir gen tarafından sentezlendiğini gösterir [36]. Bu da benzer uzunluk ve özelliklere sahip olan proteinlerin farklı şekilde modifiye edildiğine kanıttır.

Post translasyonel modifikasyonda, proteine kovalent bağlarla bir ya da daha fazla aminoasit içeren modifiye grup eklenerek proteinin özellikleri değiştirilir [37]. Bu işlem, etkinliğini, lokalizasyonunu, dönüşümü ve nükleik asitler, lipidler ve kofaktörler gibi diğer proteinler ve moleküller ile etkileşimini düzenleyebildiği için, bir proteinin doğası üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. PTM, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde enzimler aracılığı ile meydana gelir [38]. Bu enzimler; proteaz, protein kinaz, kinaz transferaz, ligaz ve fosfotazdır. Proteazlar hariç diğer enzimler, aminoasit zincirinden şeker, yağ ya da fonksiyonel bir grubu ayırma görevinde iken, proteazlar peptit bağlarını düzenler ya da parçalar. Fosfotazlar ve kinazlar, insan sağlığında diğer enzimlere kıyasla biraz daha önemli olmaları sebebi ile ilaç geliştiren araştırmacıların da içinde bulunduğu bilim insanlarının ilgisini çekmektedir [39]. Bilinen 300 den fazla PTM çeşidi vardır [40]. Bunlardan bazıları Tablo 2.1 de verilmiştir. Glikolizasyon gibi bazı PTM'ler çok genel iken, selenoylasyon (sülfatlaşma) gibi bazı PTM'ler oldukça nadirdir. Fosforilasyon gibi bazı PTM'ler geri dönüşlü iken, proteoliz gibi bazı PTM'ler ise geri dönüşsüzdür.

Tablo 2.1 Bazı Post Translasyonel Modifikasyon Çeşitleri.

Modifikasyon	Modifikasyona Uğrayan Aminoasit	Kütle Değişimi (Da)
Metilasyon	K/R	+14,017
Asetilasyon	K	+42,011
Fosforilasyon	S/T/Y	+79,970
Ubikinasyon	K	+114,020
Oksidasyon	C	+31,97 ve/veya +47,98

K: Lysin, R:Arjinin, S: Serin, T: Tironin, Y: Tirozin C: Sistein

2.3. Protein Fosforilasyonu

Tipik bir memeli hücresinde ifade edilen (expression) proteinlerin faaliyetlerinin neredeyse tümü fosforilasyon ile düzenlenmiş gibi görünmektedir. Yaşamın temel üç alanından da en iyi çalışan post translasyonel modifikasyonlardan biri fosforilasyondur [41]. Protein

fosforilasyonundan sorumlu olan enzim olan protein kinaz, şaşırtıcı sayıda gen ve protein ortaya çıkarır [42]. Yapısında fosfat grubu bulunan proteinlerin her türlü fonksiyonlarının karakterize edildiği çalışma alanına proteomiksten ayrı özel bir alan olarak fosfoproteomiks adı verilmektedir. Hücre döngüsü, büyüme, apoptoz ya da sinyal iletim yolları dahil pekçok hücreyel süreçte rol alan ve proteinlerin fonksiyonlarını düzenleyen fosforilasyon, ökaryotik hücrelerde serin, treonin ve tirozin üzerinde gerçekleşirken prokaryotik hücrelerde ise aspartik asit ve histidine üzerinde gerçekleşmektedir [43]. Nörotransmitterler, hormonlar, nörotrofik faktörler ve sitokinler dâhil neredeyse tüm hücre dışı sinyaller, hedef hücrelerinde özellikli fosfoproteinlerin fosforilasyonunu düzenleyerek çeşitli fizyolojik etkilerinin çoğunu belirler [44]. Hatta insan proteomundaki proteinlerin üçte birinin fosforilasyon substratları olduğu tahmin edilmektedir [45]. Fosforilasyon, protein fosfatazlar olarak bilinen bir enzim grubu tarafından tersine çevrilir ve buna da defosforilasyon denir [11].

Proteinlerdeki fosfat gruplarının belirlenmesi ve konumu oldukça hassas ve çok özel bir deneysel yaklaşım gerektirir. Genel olarak, bir proteinin fosforilasyon bölgelerinin analizi dört adım gerektirir: (i) fosfoprotein izolasyonu, (ii) özellikli bir proteaz ile proteolitik parçalanma; (iii) fosfatlanmış peptidlerin parçalanması ve tanımlanması ve (iv) modifiye amino asidin tam olarak tanımlanması için fosfopeptitin analizi [9].

Fosforilasyon bölgelerini tespit etmede geleneksel yöntem, hücreleri radyoaktif ^{32}P fosfat ile inkübe ederek, bu radyoaktif işaretin hücrelere ve dokulara dâhil edilmesi üzerinedir. Radyoaktif olarak işaretlenmiş protein daha küçük fragmentlere parçalanır ve HPLC' de analiz edilir. Bu yöntemin radyoaktif tehlikesinin olmasının yanı sıra, örnekte kayıplar yaşanması nedeniyle de fosforilasyonun bölgesini kesin olarak tanımlamakta genellikle başarısızdır. Diğer bir yöntem olan Edman Prosedürü de serin ve treonindeki fosfat bağları daha az kararlı olduğundan fosfopeptitleri tanılamada yetersiz kalmaktadır [11].

2.4. Fosfopeptitlerin Seçimli Olarak Zenginleştirilmesi

Fosfoproteomik çalışmanın başarısı, kararsız fosfat gruplarıyla başa çıkılabildiği durumlar artmaktadır. Fosfopeptitleri kimyasal olarak analiz edebilmek için mümkün olduğunca saf olarak izole edebilmek gerekmektedir. Yapısında fosfat grupları bulunduran proteinlerden, serin, treonin ve tirozin gibi amino asitleri içerenler tripsin gibi proteolitik enzimlerle parçalandığında fosfopeptit fragmentleri de meydana getirmektedirler [46]. Bu proteinler içerisinde en meşhur olanı, farklı bilimsel çalışmalarda model olarak tercih kazein alt birimleridir. Bununla birlikte BSA (bovine serum albumin) gibi iyi bilinen birçok büyük

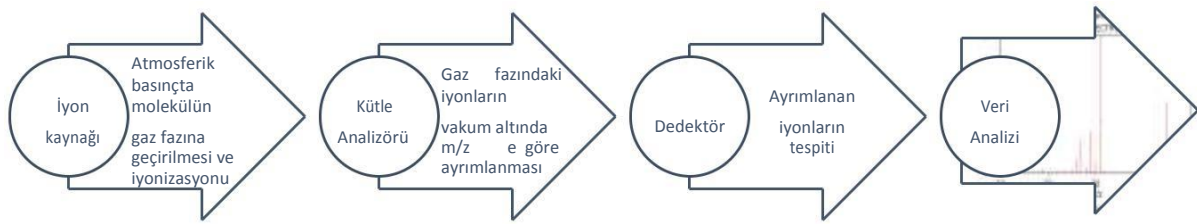
proteinde de çok sayıda fosfatlanmış bölge bulunmaktadır. Ancak bu tür proteinler üç boyutlu yapısı oldukça karmaşık olan ve çok sayıda disülfid bağı içeren proteinler olmaları nedeniyle tripsin gibi proteolitik enzimlerle kolay bir şekilde parçalanamamaktadır. Protein fosforilasyonunun dinamik doğası da göz önüne alındığında, sinyal yanıtlarının minimize edilmesi gerekir. Ayrıca fosfopeptitlerin analizi çalışmalarında ortaya çıkan diğer önemli sorun, miktarlarının azlığı sebebi ile fosfopeptitlerin mevcut analitik yöntemlerle tayin edilmelerinin zor oluşudur. Diğer peptitlerle kıyaslandığında, fosfopeptitlerin fosfat grubuna bağlı olarak toplamda daha negatif yükler içermesi de tek bir analiz ortamında fosfopeptitlerin kolay gözlenememesinin ana sebeplerinden birisidir. Biyolojik örneklerde çok düşük miktarlarda bulunan fosfopeptitleri zenginleştirmek ve tanımlamak için kullanılan en etkili yöntem kütle spektrometrisidir [47]. Bu tür sorunların önüne geçmek için; analiz öncesinde fosfopeptitlerin bulundukları ortamlardan seçimli olarak ayrılarak zenginleştirilmeleri uygulanabilecek yöntemlerden bir tanesidir. Bunun için de immobilize metal afinite kromatografisi [12], katyon-değişim kromatografisi [13], peptit immün çöktürme [14] gibi farklı uygulamalardan yararlanılmaktadır. Seçimli olarak zenginleştirilen bu fosfopeptitler, daha sonra MS ve MS/MS (tandem mass spectrometry) teknikleriyle kolay bir şekilde tayin edilebilmektedir. Kütle spektrometrisi ile protein ve peptitler için tanımlama ve dizi analizi (protein sequencing) yapılabilmesinin yanı sıra, protein ve peptitlerin yer aldığı kovalent olmayan kompleksler de (noncovalent complexes) kolaylıkla incelenebilmektedir [48].

2.5. Kütle Spektrometrisi

Kütle, bilinmeyen bir molekülün temel parametrelerinden biridir. Bir örneğin kütlelerinin tahmin edilme hassasiyeti arttıkça diğer moleküllerle etkileşim rolünü de tahmin edebilme imkânı artar. Örneğin; kütledeki değişimler yardımı ile molekülün kovalent modifikasyonundan ya da metal iyonu içerip içermediği gibi konularda fikir sahibi olunabilmektedir [49]. Kütle spektrometrisi (MS), atom ve moleküllerin kütlelerini doğrudan ölçmek yerine yüklü iyonlara dönüştürerek, bu iyonların m/z (kütle/yük) oranlarını ölçen analitik bir tekniktir [11]. Kütle spektrometresi; moleküler yörünge hesaplamalarını doğrulamak için iyonların reaksiyon dinamiği ve kimyası, iyonlaşma enerjisi, proton ve iyon afiniteleri gibi numunenin fiziksel özellikleri hakkında da bilgi verir. Bir kütle spektrumu, sinyal yoğunluğunun (ordinat), m/z 'ye (apsis) karşı olan iki boyutlu gösterimi şeklindedir. Bir pikin yoğunluğu, genellikle sinyal olarak adlandırılır ve iyon kaynağındaki analitin oluşturduğu ilgili kütle/yük oranının bolluğunu doğrudan yansıtır. Geçmişte bazı kütle

spektrometristleri m/z yerine SI birim sistemi olmayan thomson [Th] birimini kullanmaktaydı. Acak günümüzde m/z gösterimine ek olarak özellikle büyük moleküller için Da (Dalton) birimi de kullanılabilmektedir. En yüksek m/z değerine sahip sinyal, bozulmamış iyonize molekülden ($M^{+\bullet}$) kaynaklanmaktadır [4]. Bununla birlikte MALDI ya da ESI gibi yumuşak (soft) iyonlaştırma yöntemlerinde ise kuasimoleküler sinyaller ($[M+nH]^{n+}$) şeklinde karşımıza çıkabilmektedir.

MS sistemleri, sırasıyla bir iyon kaynağı, kütle ayırıcısı ve dedektör olmak üzere üç ana kısımdan oluşur. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Kütle Spektrometri Sistemi.

2.5.1. İyon Kaynakları

Başarılı bir kütle spektrometrik deneyinin anahtarı, büyük ölçüde yüksüz bir bileşiğin gaz fazındaki iyonik türüne dönüştürülmesi yaklaşımıdır [11]. Günümüzde MS sistemlerinde çok farklı iyonlaştırma türleri kullanılmaktadır. Bu iyon kaynaklarının her biri farklı bir araştırma alanına hitap edecek şekilde, hedef molekül veya atom türlerine göre değişiklik gösterir. Örneğin EI (elektron iyonlaştırma) tekniğinde analit tarafından bir elektronun fırlatılması veya yakalanması ile radikal katyon ($M^{+\bullet}$) ya da anyon ($M^{-\bullet}$) oluşturulmakta bazı tekniklerde de (örn; ESI ve MALDI) H^{+} iyonunu ya da iyonlarının analit tarafından yakalanması $[M+nH]^{n+}$ veya bırakılması $[M-nH]^{n-}$ şeklinde iyonlaşma gerçekleşmektedir. Kütle spektrometre cihazlarında elektrik ve manyetik kuvvetler uygulanarak iyonik türlerin enerjisi ve hızı kontrol edilmekte ve m/z oranları ölçülmektedir.

Tablo 2.2. İyonlaşma Modelleri.

Atomik İyonlaşma		Moleküler İyonlaşma	
	Örnek Fazı	İyonlaşma Modu	Basınç
Kıvılcım Kaynağı	Gaz	Elektron İyonlaştırma (EI)	HV
Termal İyonlaştırma		Kimyasal İyonlaştırma (CI)	IV
İndüktif Eşleşmiş Plazma İyonlaştırma (ICP)		Alan İyonlaştırma (FI)	HV
Glow Discharge		Fotoiyonlaştırma (PI)	HV
Rezonans İyonlaştırma		Yarıkararlı Atom Bombardmanı (MAB)	HV
	Çözelti	Thermospray İyonlaştırma	LV
		Atmosferik Basınç iyonlaştırma (API)	AP
		Elektrospray İyonlaştırma (ESI)	AP
	Katı	Plazma desorpsiyon	HV
		Alan desorpsiyon	HV
		Hızlı atom bombardmanı (FAB)	HV
		Matris yardımcı Lazer / Desorpsiyon İyonlaştırma (MALDI)	HV

HV: Yüksek Vakum, LV: Düşük Vakum, AP: Atmosferik Basınç, IV: Ortalama Vakum

2.5.1.1. Gaz Faz Analitlerin İyonlaştırma Teknikleri

Elektron İyonlaştırma (EI): 600 Da'dan daha az moleküler kütleye sahip organik bileşikler için en popüler iyonizasyon şeklidir [50]. Bu iyonlaştırmada, buharlaştırılmış numune molekülleri, düşük basınç altında (yaklaşık 10^{-5} ila 10^{-6} torr vakum değerlerinde) elektron demeti ile bombardımana tabi tutulur. Çarpışma işlemi sırasında hedef molekülden (M) bir elektron atılır. Moleküler iyon veya radikal katyon olarak adlandırılan bu pozitif iyon $M^{+•}$ sembolü ile temsil edilir. Bazı durumlarda elektron yakalama neticesinde $M^{-•}$ tipinde radikal iyonlarda oluşabilmektedir. Bu iyonlaşma işlemi esnasında 70 eV enerjiye sahip elektronlar iyonlaştırılacak moleküldeki kimyasal bağların kopmasına neden olduğundan analiz edilen moleküle ait iyon parçaları (fragment) oluşmaktadır. Bu durum karmaşıklık gibi görülsede molekülün tanımlanması ve veri tabanlarıyla karşılaştırma esnasında büyük fayda ve doğruluk sağlamaktadır. EI'nin kullanımı basittir ve çoğu organik bileşen için veri tabanı spektrumları mevcuttur. Bu sayede moleküler kütle ve hedef bileşiklerin yapısı rahatlıkla belirlenebilmektedir. Bununla birlikte, EI'nin önemli bir kısıtlaması, analitlerin, iyonizasyondan önce gaz fazında olması gerekliliğidir. Uçuculuğu kimyasal türevlendirmelerle sağlanamayan bileşikler EI yöntemi ile analiz edilememektedir.

Kimyasal İyonlaştırma (CI): Rezonans elektron yakalama (REC) olarak da adlandırılan bu süreç, H_2 , CH_4 , N_2 gibi gazların varlığında yüksek verimlilikle ortaya çıkar. Nitro grupları, halojen atomları veya konjuge elektron sistemleri için negatif iyon kimyasal iyonlaştırma (REC-CI) daha pratik bir yöntemdir. Bu bileşikler negatif iyon modunda analiz edildiğinde, algılama hassasiyetinde 100 ila 1000 kat artış elde edilir. CI ile erişilebilen bileşiğin üst kütle sınırı yaklaşık 1000 Da civarındadır [4].

Fotoiyonlaştırma (PI): Fotoyionizasyon (PI), küçük molekülleri iyonize etmek için başka etkili bir işlemdir. EI dan farklı olarak, PI da elektron demeti yerine yüksek enerjili foton demeti kullanılmaktadır. Foton ışını, genellikle döteryum lambası, Kr-excimer lambası veya 118-nm Nd: YAG lazer gibi bir vakum ultraviyole (VUV) radyasyon kaynağından elde edilmektedir. Örnek olarak, Ne, Ar, Kr, veya Xe gazı olarak, sırasıyla 83, 126, 147 veya 172 nm'de ışınım üretirler. PI ile analiz edilecek numune için analiz şartı, gaz fazında olmasıdır. Katı numuneler, fotoiyonlaştırmadan önce buharlaştırılmalıdır. Termal buharlaşma veya lazer desorpsiyonu, katı örnekleri gaz fazına geçirmek için en uygun araçlardır [51].

Alan İyonlaştırma (FI): Alan iyonlaştırmada (field ionization) gaz fazındaki numune 10^8 V cm^{-1} mertebesinde güçlü bir elektrik alanına enjekte edilir. FI, esas olarak bir moleküler

iyon sinyali üreten çok yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir. Sadece uçucu numunelere uygulanabilmektedir.

Yarı-Kararlı Atom Bombardmanı İyonlaştırma (MAB): Gaz faza geçebilen organik maddeler için diğer bir uygun teknik olan MAB (Metastable Atom Bombardment Ionization), yaklaşımında iyonlaşma reaksiyonu eşitlik 1’de gösterilen türdeki süreç ile numunenin bombardmanı ile gerçekleşir. Reaksiyonda gösterilen işlem, analitin radikal moleküler iyonunu üretmek için elektrofilik bir reaksiyonu içermektedir. A'nın uyarılma enerjisi analit molekülünün iyonlaşma enerjisini aşmalıdır. Örneğin, soygaz atomlarının mevcut enerji aralığı 8,3 eV ile 20,6 eV’dir. Yarı kararlı N₂ atomları ise 8,5 eV ile 11,9 eV enerji aralığına sahiptir. Böylece MAB ile analit moleküllerinin seçici iyonlaşması mümkün olabilmektedir.



2.5.1.2. Katı Faz Analitlerin İyonlaştırma Teknikleri

Alan Desorpsiyonu (FD): Uçucu olmayan ve termal olarak kararsız maddeleri iyonize etmek için kullanılan yöntemdir. FD (Field Desorption) yönteminde diğer desorpsiyon ya da iyonlaştırma yöntemlerinden farklı olarak, bir örneği iyonlaştırmak için hiçbir birincil foton ya da elektron kullanılmaz. Bunun yerine, uçucu olmayan numune, ince bir metalik tel örgü üzerinde keskin mikro-kenarlı yapılara uygulanır ve yüksek bir elektrik alan (10⁸ Vcm⁻¹) ile bozulmamış gaz fazı iyonları olarak desorbe edilir. En önemli uygulama alanları; karbonhidratlar, peptitler, organometalikler ve endüstriyel polimerler gibi uçucu olmayan bileşiklerdir [52].

Plazma Desorpsiyon İyonlaştırma (PD): 1974 yılında Torgerson tarafından bulunan Californium-252 (²⁵²Cf) plazma desorpsiyonu (PD) iyonizasyonu, uçucu olmayan, kutupsal ve termal olarak kararsız moleküllerin analizlerinde kullanılır. Plazma ışınının darbeleri yapısı nedeniyle, PD, TOF (Time-of-Flight) kütle spektrometrisine iyi adapte edilmiştir. Bu teknikte, örnek; ince bir alüminyum folyo veya başka bir uygun malzeme üzerinde katı bir film olarak çöktürülür ve bir plazma ışını tarafından bombardıman edilir. Plazma bir ²⁵²Cf kullanılarak üretilmektedir. Örnek hazırlama, PD-MS analizinde kritik bir adımdır. Alkali metal tuzları ve diğer safsızlıklar, analit sinyalini söndürebildikleri için ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Numunenin nitroselüloz gibi uygun bir matriks üzerine çöktürülmesinin ardından ultra saf su ile yıkanması, alkali metal iyonu safsızlıklarını giderir. Bunun

sonucunda çok daha keskin bir analit sinyali üretilir. Plazma desorpsiyonu önceki yıllarda biyomoleküllerin moleküler kütesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. PD yoğun olarak kullanıldığı eski dönemlerde proteinler ve peptidlerdeki posttranslasyonel modifikasyonları belirlemede ve triptik haritalar hakkında bilgi elde etmede oldukça önemli bir yöntemdi. PD-MS'nin önemli bir diğer başarısı da, proteinler gibi büyük moleküllerin başarılı bir şekilde gaz fazında iyonlar haline getirilebileceğini gösteren ilk yöntemlerden biri olmasıdır [4]. Günümüzde MALDI ve ESI gibi daha başarılı yöntemlerin geliştirilmesiyle biyomoleküler alandaki kullanımı son bulmuştur.

Hızlı Atom Bombardımanı (FAB): FAB Yöntemi 1980 yılında Michael Barber tarafından Manchester Üniversitesinde geliştirilmiştir [53]. Bu iyonlaştırma mekanizmasında, analiz edilmek istenen örnek polar, nispeten daha az uçucu sıvı bir matriks (örn., Gliserol) içinde çözülür ve örnek-matriks karışımı, yüksek enerjili (keV) atom veya iyon demetiyle bombardımana tabi tutulmaktadır [11]. Bu özellikleriyle günümüzde başarıyla kullanılan MALDI yöntemiyle benzerlik taşımaktadır. Yüksek molekül ağırlığındaki bileşiklerin analizlerinde kullanılabilen ilk iyonlaştırma yöntemleri arasında bulunan FAB, günümüzde MALDI tekniğinin yüksek başarısı nedeniyle fazla kullanım alanı bulamamaktadır.

Lazer Desorpsiyon İyonlaştırma (LDI): Tüm bileşikler kullanılan lazer türünün dalga boyundaki radyasyonu soğurmadığı için her bileşik Lazer desorpsiyon iyonlaştırma (LDI) için uygun değildir. Sadece 1000 Da'nın altında kütleyle sahip olan bileşikler, LDI ile analiz edilebilmektedir. Bununla birlikte analitik duyarlılığı da oldukça zayıftır. LDI deneylerinin diğer yöntemlere göre artışı, lazer ışık demetini soğuran amino asitlerin ve peptitlerin desorpsiyon/iyonlaşma etkinliğinin kromofor grubu bulunmayanlara göre daha fazla olmasıdır.

Matriks Yardımlı Lazer/Desorpsiyon İyonlaştırma (MALDI): MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization), büyük biyopolimerlerin çalışmalarına büyük ölçüde devrimsel yaklaşımlar getirmiştir. Bu yöntemde diğerlerinden farklı olarak analiz edilecek numune ile kimyasal reaksiyona girmeyen, lazerin dalga boyu aralığındaki enerjiyi absorblayabilen matriks adı verilen bir madde ile örneğin muamele edilmesi gerekmektedir. MALDI'de numune, UV absorblayıcı matriks malzeme ile numune/matriks oranı hacimce yaklaşık 1:50000 kat olacak şekilde hazırlanır ve kurutulur. Numune, genelde 266 nm ile 366 nm dalga boyundaki lazer ışınına ile bir kaç saniye aralıklarla maruz bırakılır. Bu esnada matriks ile birlikte moleküler safsızlıklarda uçucu hale gelir. Gaz fazındaki numune, genellikle sodyum veya potasyum gibi alkali metallerle protonasyon işlemi ile tek tek iyonize edilir.

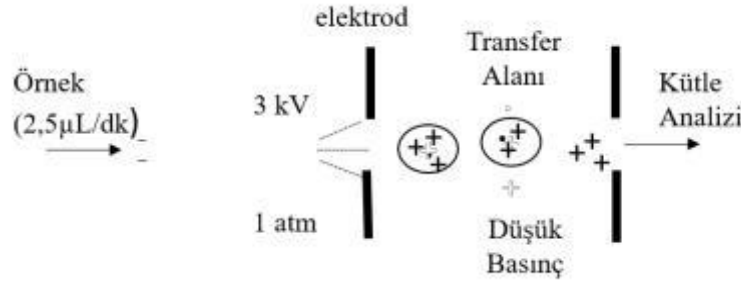
Kütlelerinden bağımsız olarak MALDI, tarafından üretilen iyonların hızları sabittir. Bu özellikler, en basit MS saptama tekniğine, yani uçuş süresine (Time-of-Flight) çok uygundur [54]. Mükemmel hassasiyeti, nispeten yüksek hızı ve basitliği nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir analitik teknik olan MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-Time-of-Flight), tek başına yüklü iyonlar üretmenin bir sonucu olarak proteinler, oligonükleotitler ve glikoproteinler gibi biyomoleküllerin analizinde sıklıkla tercih edilir. Numune alma ve lazerli analizin tekrarlanabilirliğinin olmaması MALDI analizlerinin negatif tarafıdır. Sinyal yoğunlukları matriks-analit kristallerinin yoğunluğuna bağlıdır. Bu nedenle örnekler son derece homojen hazırlanmalıdır. Tekrarlanabilirliği sağlamak için analitin izotopik olarak hazırlanmış bir örneğinin iç standart olarak kullanılması en uygun çözümdür [55].

2.5.1.3. Sıvı Faz Analitlerin İyonlaştırma Teknikleri

Termo Spray İyonlaştırma: Termospray, özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografileri (HPLC) için uygun bir iyonizasyon modudur. Peptitler, dinükleotitler, pestisitler, ilaçlar, boyalar ve çevresel kirleticiler gibi çeşitli bileşikler, termosprey iyonlaşma ile analiz edilebilir. Ayrıca LC/MS (Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometri) uygulamaları için de etkili bir arayüzdür.

Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonlaştırma (APCI): APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) tekniği sıvı fazdaki analitlerin kütle spektrometre sistemleriyle analizlerinde başarıyla kullanılan bir iyonlaştırma tekniğidir. Bu nedenle günümüzde LC (sıvı kromatografisi), HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi), UPLC (ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi) gibi sistemler sayesinde birbirinden ayrılarak elde edilen analit moleküllerinin yine sıvı fazındaki kütle spektrometrik analizlerinde tercih edilmektedir. Ancak üst kütle aralığı 1500 Da civarında olan, polaritesi nispeten daha düşük ve termal olarak kararlı bileşiklere uygulanabilmektedir. APCI'deki iyonlaştırma prensibi, alışılmış CI için tarif edilenle neredeyse aynıdır. Tek fark; örnek molekülleri ve reaktif iyonları arasında çok daha fazla iyon-molekölü çarpışmasının meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte alışılagelen ve vakum altında gerçekleştirilen CI tekniğinden farklı olarak vakum olmayan atmosferik basınç koşullarında başarıyla uygulanabilmektedir. Daha da geliştirilmiş özel ekipmanlar sayesinde iyonlaştırma verimliliği ve hassasiyeti önemli ölçüde artırılmıştır.

Elektrospray İyonlaştırma (ESI): Sıvı fazdaki örnekler için en uygun iyonlaştırma yöntemleri arasında bulunan ESI (electrospray ionization), büyük biyomoleküllerin nitel/nicel analizleri ve LC / MS uygulamaları için de en başarılı iyonlaştırma arayüzü olarak kabul edilmektedir. Elektrosprey kavramı 1968'de Malcom Dole tarafından ortaya atılmış olsa da ESI-MS'nin gelişimi ve özellikle büyük moleküllerin (protein, peptit, oligonükleotit vb.) analizlerindeki uygulanabilirliği açısından, 2002 Nobel Kimya Ödülü'ne de layık görülen John B. Fenn sayesinde olmuştur [56].



Şekil 2.2. ESI iyonlaşmanın Basit Gösterimi [56].

Elektrosprey analizi, pozitif ve negatif iyonlaştırma modlarında gerçekleştirilebilir. Tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) çalışmalarına gerek kalmadan iyonların parçalanma işlemleri, numunenin gönderildiği ESI bölgesindeki voltaj değerleri değiştirilerekte yapılabilmektedir. Bu süreç, nozul-skimmer (NS) ayrışması olarakta bilinmektedir.

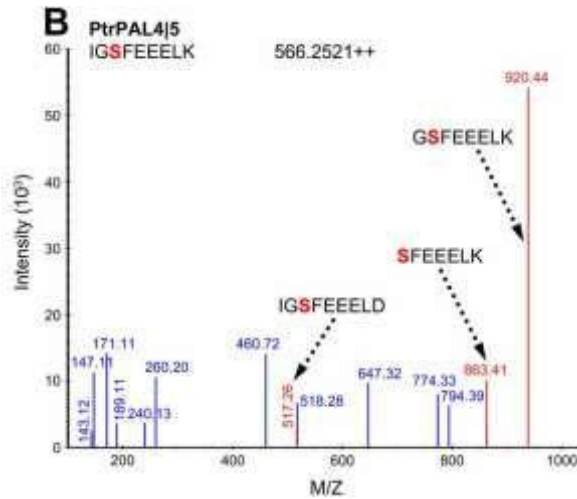
2.5.2. Kütle Ayırıcılar

Proteinler gibi kompleks biyolojik karışımların analizinde ilk boyut, örneği kromatografik olarak bileşenlerine ayırmadır. Etkin bir ayırma yapabilmek için ayırıcı ve dedektör havadaki iyonlardan etkilenmemesi adına vakumlu ortamda tutulur. Ayırma elektrik alan veya manyetik alan aracılığı ile yapılabilir. Fosfopeptitler gibi oldukça az miktarda bulunan maddeler için alternatif olan LC-MS/MS (Liquid Chromatography Tandem Kütle Spektrometrisi) iki farklı kütle ayırıcı bileşenin bir arada kullanıldığı MS sistemleridir. Bu tür MS sistemlerinde ilk kütle ayırıcısında seçilen iyonlar, iki kütle ayırıcısı arasında yer alan bir CID (Collisionally Induced Ionization) hücresinde inert gaz (N₂, Ar, He gibi) yardımı ile parçalanabilmekte ve oluşan iyon parçaları (fragment ions) ikinci kütle analizatöründe daha detaylı analiz edilmektedir. Bu sayede her türlü analit molekülüne ait özgü iyon parçaları taranabilmekte ve kromatografik ayırmanın performansından bağımsız olarak çok düşük derişimlerde nicel ve nitel analizler yapılabilmektedir.

Kütle spektrometresi, sadece peptidlerin ve proteinlerin moleküler kütlelerinin kesin belirlenmesine değil, aynı zamanda, özellikle tandem kütle teknikleri ile kullanıldığında, post-translasyona bağlı dizilerin belirlenmesine de imkân vermektedir [57].

2.5.3. Fosfopeptitlerin Kütle Spektrometrisi ile Analizi

Proteinlerin fosforilasyonun tanımlanması ve bölgelerinin belirlenmesi, belirli bir durumda hangi proteinlerin veya hücresel yolların aktive edilebileceğine dair ipuçları sağlamaktadır. Birkaç yıl öncesine kadar sadece az sayıda fosforilasyon bölgesi tanımlı iken kütle spektrometrisi (MS) sayesinde, özel analitik ölçüm metotlarının geliştirilmesine yönelik yeni stratejiler ve ilerlemeler sayesinde, fosforilasyon alanlarının büyük ölçüde haritalanması mümkün hale gelmiştir. Fosforilasyon içeren örneklerde molekül başına bir, iki veya üç fosfat gurubu taşıyan fosfatlanmış molekül formları (şekil 2.3.) numunenin yaklaşık yarısını oluştururken, kalan yarısı fosfatlanmamış moleküllerden oluşması nedeniyle klasik yöntemlerle analizler esnasında gözden kaçabilmektedir.



Şekil 2.3. Proteomik Bir Çalışmada Fosfopeptitlerin ESI-MS Analizleri [58].

Proteom çapındaki protein fosforilasyonları kütle spektrometresi ile belirlenirken, yanlış pozitif sonuçların en aza indirilmesi, fosforilasyon bölgelerinin doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlayarak hücre sinyal ağlarının keşfedilmesinde oldukça önemlidir [24]. Fosfopeptitler, kendilerine eklenen her bir fosfat (PO_4^{3-}) için 80 Da'lık bir kütle artışı gösterir. Bu sayede fosforilasyon bölgelerini içeren peptitlerin tanımlanmasının en basit yöntemi olan kütle haritalaması daha kolay hale gelmektedir. Fakat buna rağmen fosforilasyon bölgesinin tanımlanması oldukça karmaşıktır; çünkü fosforilasyon sadece bir protein sekansındaki spesifik bir bölgede meydana gelir ve tipik olarak sadece bir triptik peptit, ilgili fosforilasyon bölgesini içerir. Bazı çalışmalarda üzerinde özellikle durulan ilgili birkaç peptidi net bir

şekilde ortaya çıkarmak, analiz etmek, peptidin amino asit dizisini belirleyebilmek ve/veya fosforilasyon bölgesinin yerini kesin olarak doğrulamak amacıyla zenginleştirme yapılması gerekmektedir. Fosfopeptit zenginleştirme, numunenin seçimli bir şekilde saflaştırmasıyla gerçekleştirilmektedir. Fosfopeptit zenginleştirme için uygun yöntemi seçmeden önce, çalışmanın amacı, örnek özellikleri, başlangıç materyali miktarı ve her zenginleştirme yönteminin sunduğu avantaj ve dezavantajlar gibi bazı hususları dikkate almak oldukça önemlidir. Homojen yüzeyler elde edilebilmesi, düşük sıcaklıklarda sentezlenebilmeleri, kolayca modifiye edilebilmeleri nedeniyle ve özellikle biyomalzeme olarak uygunlukları sebebi ile sol-jel malzemeler fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında son derece avantajlıdır.

3. DENEYSEL BİLGİLER

3.1. Kimyasallar

Fosfopeptit zenginleştirme amacıyla yapısında fosfopeptit bulunduran proteinlerden BSA, β -kazein, tripsin, iyodoasetamid, üre, asetonitril, hidroklorik asit, nitrik asit ve amonyumbikarbonat Sigma (Steinheim, Almanya) firmasından, metanol ve formik asit ise Fluka (ABD) firmasından temin edilmiştir. Deneyde kullanılan tüm çözeltiler ve deney malzemelerini yıkamak için gereken su, Elga Pure Lab Options Q (High Wycombe, Birleşik Krallık) deiyonize su sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

3.2. Sol-Jel Malzemelerin Sentezi

Klasik üretim metodları ile üretimi mümkün olmayan malzemeler için geliştirilen tekniklerden, uygulanabilirlik açısından polimer pirolizi ya da kimyasal çöktürme gibi diğer yöntemlere kıyasla daha kolay olan sol-jel tekniği “solution-gelation” terimlerinin kısaltması olarak adlandırılmaktadır. Sol-jel prosesi çoğunlukla seramik sanayiinde kullanılan bir yöntem olsa da bir süspansiyon ya da çözeltinin jelleşmesine ihtiyaç duyulan tüm alanlarda kullanılabilir. Kompleks protein bileşimlerinde çok az miktarda bulunan ve bu sebeble de analizi güçleşen fosfopeptitlerin içeriğinde bulunan fosfat gruplarını başarılı bir şekilde yakalayan $C_6H_6MgO_7$ içerikli sol-jellerin sentezi (Tablo 3.1) esnasında Tetraetilortosilikat (TEOS) ve etil alkol (1:1 hacimce) bir beherde karıştırılmıştır. Ayrı bir beherde 0,3 gr $C_6H_6MgO_7$ ultra saf su (3,0 mL) ile çözünmüş ve iki ayrı malzeme IKA RT 10 POWER (Almanya) manyetik karıştırıcı da 850 rpm de karıştırılmaya bırakılmıştır. PEG (Mw ~600) içeren örnekler malzemeye, su ve $C_6H_6MgO_7$ aşamasında eklenmiştir. Yaklaşık 25 dakika sonra homojen bir karışım elde edildiğinde ortama 1,0 mL hacimde farklı asitler (HNO_3 , HCl ve H_2PO_4) damla damla eklenerek çözelti 48 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda katı sol-jel ağ yapısının olduğu gözlenmiş, yapı içerisindeki safsızlıkları gidermek amacıyla elde edilen sol-jel partiküller iki hafta boyunca etil alkol-su (50:50, v/v) karışımı kullanılarak sürekli yıkanmıştır. Yıkama işlemlerinin ardından jel partikülleri yaklaşık 56 °C de 24 saat vakum etüvünde kurutulduktan sonra kullanıma hazır şekilde falkon tüplere konulmuştur.

Tablo 3.1. C₆H₆MgO₇ İçeren Sol-Jellerin Kimyasal Oranları.

Örnek Kodu	TEOS	Etanol	Su	Asit	Diğer Malzeme
C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ @TEOS (3B)	2,5 mL	2,5 mL	3,0 mL	1,0 mL H ₃ PO ₄	0,3 g C ₆ H ₆ MgO ₇
C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ @TEOS (3C)	2,5 mL	2,5 mL	3,0mL	1,0 mL HNO ₃	0,3 g C ₆ H ₆ MgO ₇
C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl@TEOS (3D)	2,5 mL	2,5 mL	3,0mL	1,0 mL HCl	0,3 g C ₆ H ₆ MgO ₇
C ₆ H ₆ MgO ₇ -HCl-PEG@TEOS (3H)	1,5 mL	1,0 mL	0,4 mL	80,0 µL HCl	0,1 g C ₆ H ₆ MgO ₇ 0,3 mL PEG600
C ₆ H ₆ MgO ₇ -HNO ₃ -PEG@TEOS (3I)	1,5 mL	1,0 mL	0,4 mL	80,0 µL HNO ₃	0,1 g C ₆ H ₆ MgO ₇ 0,3 mL PEG600
C ₆ H ₆ MgO ₇ -H ₃ PO ₄ -PEG@TEOS (3J)	1,5 mL	1,0 mL	0,4 mL	80,0 µL H ₃ PO ₄	0,1 g C ₆ H ₆ MgO ₇ 0,3 mL PEG600

3.3. Sol-Jellerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection - Fourier Transform Infrared) Spektroskopisi

Tez kapsamında gerçekleştirilen ATR-FTIR spektroskopisi ölçümleri Nicolet IS 50 Attenuated Total Reflection - Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm spektrumlar az miktarda örnek ve örnek kalınlığından bağımsız olarak 600 cm⁻¹ ve 4000 cm⁻¹ arasında 32 tarama yapılarak kaydedilmiştir.

3.3.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Tez kapsamında gerçekleştirilen termogravimetrik analizler ve üretilen malzemelerin ısı özellikleri, TA Instrument SDT Q600 (New Castle, DE, ABD) model Termogravimetrik Analiz (TGA) cihazı ile yapılmış olup; toz hale getirilen örnekler yaklaşık 1,0 mg kadar tartılıp 25 °C oda sıcaklığından başlanarak dakikada 10 °C artış ile 700 °C ye kadar ısıtılmış

ve sıcaklığa karşı kütle kayıpları yüzde (%) olarak kaydedilmiştir. Çalışma gazı olarak azot (N₂) kullanılmış ve akış hızı 100 mL/dk. olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.3.3. XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy)

Tez kapsamında sentezlenen soljel malzemelerin yüzey analizleri monokromatik Al K α X ışını kaynaklı K-Alpha X-ray Photoelectron Spektrometre (XPS) (Thermo Scientific, İngiltere) cihazı ile 30 eV ve 200 eV geçiş enerjisi (pass energy) kullanılarak yapılmıştır. Tüm örnekler 90°'lik ayrılma açısı (take-off angle) kullanılarak analiz edilmiştir. Yüzey element bileşimleri, X-ışınları noktasal alan boyutu 400 μ m ayarlanarak, 0 ile 1000 eV arasında değişken enerji kullanılarak belirlenmiştir. Bağlanma enerjileri (Binding energies, BEs) 285 eV'deki C1s sinyali referans alınarak tanımlanmıştır. Tanımlama limiti <0,1 atomik yüzde olan spektrometre için yüzeyden 5 nm altına kadar analiz edilen sol-jel malzemelerin çalışma elektrodu olarak Bakır (1 cm x 1 cm) kullanılmıştır.

3.4. Proteinlerin Tripsin Enzimi ile Parçalanması

Serin, treonin ve tirozin amino asitlerini barındırdığı için fosfat grubu içeren çok sayıda protein bulunmaktadır. Bu proteinler tripsin gibi proteazlarla parçalandıklarında fosfopeptit fragmentleri oluştururlar. Kazein alt birimleri (α S1, α S2, β ve κ -kazein) bu tür proteinler içerisinde en çok bilinenlerdir. Bu nedenle bilimsel çalışmalarda sıklıkla model fosfoprotein olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu çalışmalarda BSA (bovine serum albümin) gibi büyük proteinlerin proteolitik peptitleri kullanılarak kazein alt birimlerinden elde edilen fosfopeptitlerin doğal ortamlarını taklit eden karışım çözeltileri elde edilmektedir. Üç boyutlu yapısı oldukça karmaşık olan ve 585 amino asitten oluşan BSA tripsin enzimi ile parçalandığında çok sayıda peptit fragmenti oluşturularak fosfopeptiler için doğal bir matriks işlevi görmektedir. Çok sayıda disülfid bağı içeren BSA gibi proteinlerin tripsin enzimiyle parçalanma işlemlerinde bazı ek uygulama ve kimyasal maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Pankreas tarafından üretilen tripsin enzimi *in vivo* ve *in vitro* olarak çok farklı işlemlerde kullanılmaktadır. Bu enzim uzun peptit zincirlerini lizin ve arjinin aminoasitlerinin karboksil gruplarından kesmektedir. Bu çalışmada model protein olarak kazein proteinin alt birimi olan β -kazein kullanılmıştır. Zenginleştirme çalışmalarında fosfopeptitlerin bulundukları doğal ve karmaşık ortamı oluşturmak için BSA'dan elde edilmiş peptit çözeltisinden faydalanılmıştır. Bu amaçla 9,0 mg tripsin enzimi 10,0 mL 50 mM (NH₄)₂CO₃ tampon çözeltisi içinde çözülmüş ve ayrı falkon tüpler içerisinde bulunan 5,0 mg β -kazein ve aynı miktardaki BSA içerisine ayrı ayrı yaklaşık 5,0 mL hacminde eklenmiştir. Karışımlar 37 °C de 2 saat süreyle inkübe edilmiş ve 2 saatin sonunda sadece

BSA çözeltisine ek olarak 250 µL 8 M'lık üre çözeltisi eklenerek 56 °C'de yarım saat daha inkubasyona bırakılmıştır. Daha sonra sisteinlerin oluşturduğu disülfid bağlarını kırarak proteinlerin katlanmış yapılarını açan 100 mM 250 µL 1,4-dithiothreitol (DTT) çözeltisi ilave edilmiş ve 56 °C'de bir saat daha bekletilmiştir. Son olarak BSA çözeltisinde DTT'nin kırmış olduğu bağları stabilize ederek yeniden bağlanmalarını engelleyen ve indirgenmiş sistein kalıntılarını alkilleyen 20 mM'lık iodoasetamid (IAA) çözeltisinden 250 µL ilave edilerek enzimatik parçalanmanın tamamlanması için çözelti karanlıkta ve oda sıcaklığında bir saat bekletilmiştir. Her bir çözeltiye ayrı ayrı 0,5 mL formik asit ilavesi yapılarak tripsinle parçalanma işlemi durdurulmuştur. Enzimatik parçalanma sonucu elde edilen peptit çözeltileri analizler öncesinde -80 °C'de saklanmıştır.

3.5. Fosfopeptitlerin Sentezlenen Sol-Jel Malzemeler ile Zenginleştirilmesi

Bu çalışmalarda öncelikle peptit parçaları içeren kompleks çözeltiler içerisinde fosfopeptitlerin sentezlenen sol-jel malzemelerin yüzeyine seçimli bir şekilde tutunabilmeleri için en uygun pH değerleri belirlenmeye çalışılmıştır. Farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde en uygun pH değerinin yaklaşık 4,0 olduğu bulunmuştur. pH ayarlamaları Mettler Toledo Seven Multi pH metre (Columbus, OH, ABD) ile yapılmıştır. pH=4,0 değerine sahip 100 mM asetat tamponu: asetonitril: formik asit (4:1:0,1 hacimce) karışımı kullanılmıştır. Yaklaşık 10,0 mg sol-jel malzeme hassas analitik terazide tartılmış ve bu malzeme 1,0 mL adsorpsiyon çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. β-kazein ve, sığır serum albumin (BSA) proteinlerinin tripsin yardımıyla elde edilmiş proteolitik çözeltileri mol oranı olarak yaklaşık 50:1 olacak şekilde birbiriyle karıştırılmış ve sol-jeller ile birlikte 10 dakika bekletilmiş ve bu sayede daha karmaşık ortamdaki zenginleştirme kabiliyetleri incelenmiştir. Sol-jel malzemeler üzerine 100 µL hacimde ilave edilen protein karışımları 45 dk boyunca 50 rpm'de santrifüj yapılarak sol-jeller çöktürülmüştür. Sol-jeller üzerinde bulunan sıvı başka bir kaba alındıktan sonra, sol-jellerin adsorpsiyon koşullarını sağlayan çözelti ile 2 kez daha yıkanmış ve bu şekilde özgün olarak bağlanmayan peptitlerin sol-jel yüzeylerinden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son olarak 50,0 µL ACN: deiyonize su: formikasit (1:1:0,1 hacimce) desorpsiyon çözeltisi sol-jeller üzerine ilave edilerek (pH=1,0) sol-jellerin yüzeylerinde tutunan fosfopeptitlerin ayrılarak çözelti içerisinde alınması sağlanmıştır. Elde edilen örnekler LC-MS/MS analizleri için viallere aktarılmıştır.

3.5.3. Fosfopeptitlerin ESI Kütle Spektrometrisi ile Tayini

Tez kapsamında zenginleştirme işlemi yapılmış ve yapılmamış örneklerin kütle spektrumları Thermo Scientific TSQ Quantiva üçlü kuadrupol kütle spektrometresi (San Jose, CA, ABD) ve Ultimate 3000 HPLC sistemine sahip LC-MS/MS sistemiyle elde edilmiştir. HPLC kısmında 0,5 mL/dk akış hızı ile hacimce 0,1 oranında formik asit ilave edilmiş ACN ve ultra saf su 50:50 (v/v) içeren hareketli faz izokrotik olarak kullanılarak, HPLC sistemiyle infüzyon yapılmıştır. Kütle spektrometresi parametreleri ise ESI iyon kaynağında pozitif iyon modunda 4000 V, 375 °C iyon transfer tüpü sıcaklığı, süpürme (sweep) gazı 1,0 perdeleme (sheat) gazı 20,0 ve dış (aux) gaz basınçları 5,0 (arbitrary units) olacak şekilde ayarlanarak veriler elde edilmiş ve bilgisayara kaydedilmiştir.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

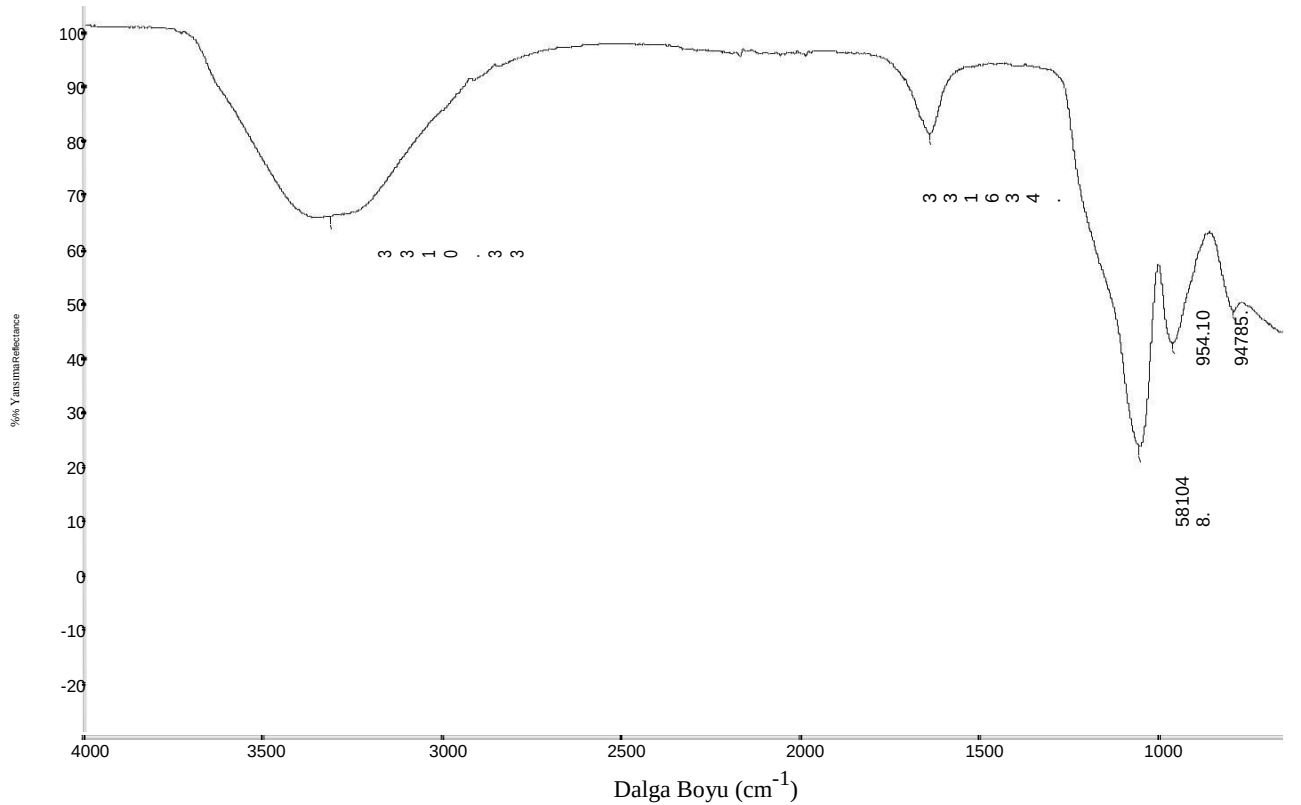
Son derece önemli faaliyetlerde görev alan fosfoproteinlerin tayini ve yapılarının aydınlatılması için diğer biyolojik makromoleküllerde olduğu gibi yine kütle spektrometrisi (mass spectrometry, MS) en etkin teknik olarak kullanılmaktadır. 1980’li yılların ortalarında özellikle elektrosprey iyonlaştırma (Electrospray Ionization, ESI) ve matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) gibi yeni iyonlaştırma yöntemlerinin geliştirilmesiyle; protein, peptit, DNA, RNA, sentetik polimerler, büyük organik ve inorganik kompleksler gibi makromoleküllerin analizleri kütle spektrometrik olarak yapılabilir hale gelmiştir [59]. Bu gelişmeler ışığında, özellikle proteomik ve genomik gibi “omik” çalışma alanlarında önemli aşamalar kaydedilmiş ve bu çalışmalar için kütle spektrometrisi vazgeçilmez bir hale gelmiştir. Bu tür çalışmalarda, analiz edilecek moleküllerin iyonlaşma verimi ve diğer özelliklerine bağlı olarak analiz parametrelerinin belirlenerek optimize edilmesi çok önemlidir. Oldukça hassas bir analiz yöntemi olan LC-MS/MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) ve ESI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry) gibi yöntemlerle femtomol veya attomol seviyelerinde rahatlıkla tayin yapılabilmesine rağmen, fosfopeptitlerin miktarları tayin sınırlarının altında kalabilmektedir [60]. Bunun en önemli sebebi olarak, özellikle doğal örneklerle çalışılırken ortamda bulunan diğer protein ve peptitlerin sinyalleri arasında fosfopeptit sinyallerinin kolay gözlenememesi veya fosfopeptitlerin iyonlaşma verimlerinin diğer peptitlerden daha düşük olması olarak ifade edilebilir. Diğer peptitlerle kıyaslandığında, fosfopeptitlerin fosfat grubuna bağlı olarak toplamda daha negatif yükler içermesi de tek bir analiz ortamında fosfopeptitlerin kolay gözlenememesinin ana sebeplerinden birisidir. Bu tür sorunların önüne geçmek için; analiz öncesinde fosfopeptitlerin bulundukları ortamlardan seçimli olarak ayrılarak zenginleştirilmeleri uygulanabilecek yöntemlerden bir tanesidir.

Bu tez kapsamında, model fosfoprotein olarak beta kazein (β -kazein) seçilmiş ve beta kazein’in tripsin ile proteolitik olarak parçalanması sonucu elde edilen peptit karışımı içerisinde fosfopeptitlerin, diğer fosfatlanmamış peptitlerden ayrılması için katyonik özellikte magnezyum içerikli sol-jeller sentezlenmiştir. Fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında kullanılabilecek nitelikteki tüm malzemelerin yapısal karakterizasyonları Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spektroskopisi, X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ve termogravimetrik analiz (TGA) yöntemleriyle

gerçekleştirilmiştir. Üretilen farklı malzemeler β -kazein'den elde edilen model fosfopeptitlerin zenginleştirme çalışmalarında kullanılmış malzemelerin zenginleştirme potansiyelleri ESI-MS tekniği ile LC-MS/MS'de incelenmiştir. Tamamlayıcı çalışmalarda β -kazein fosfopeptitlerinin bulunduğu karışım ortamını daha kompleks hale getirebilmek amacıyla BSA proteini de tripsin ile parçalanarak, oluşan peptit karışımları da β -kazein peptit karışımlarına eklenmiştir. Bu şekilde fosfopeptitlerin bulundukları doğal ortamlarına benzer bir biyolojik karmaşa yaratılmaya çalışılmış zenginleştirme performansları değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda, hücresel döngüler içerisinde oldukça önemli görevleri olan ve kanser vb. ciddi hastalıklarla yakın ilişkide olduğu bilinen fosfopeptitlerin [61] zenginleştirilmesine yönelik malzemelerin yanı sıra, bu malzemelerin kullanıldığı kütle spektrometrisi tabanlı yeni ölçüm metotları da geliştirilerek elde edilen veriler yeni bir yaklaşımla açık kaynak kodlu mmass kütle spektrometrisi yazılımıyla (www.mmass.org) değerlendirilmiştir. Bu şekilde günümüze kadar benzer amaçlarla yapılan fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarından farklı olarak, görsel değerlendirme dışında, tamamen matematiksel bir yaklaşımla, zenginleştirme potansiyelleri ortaya konulmuştur.

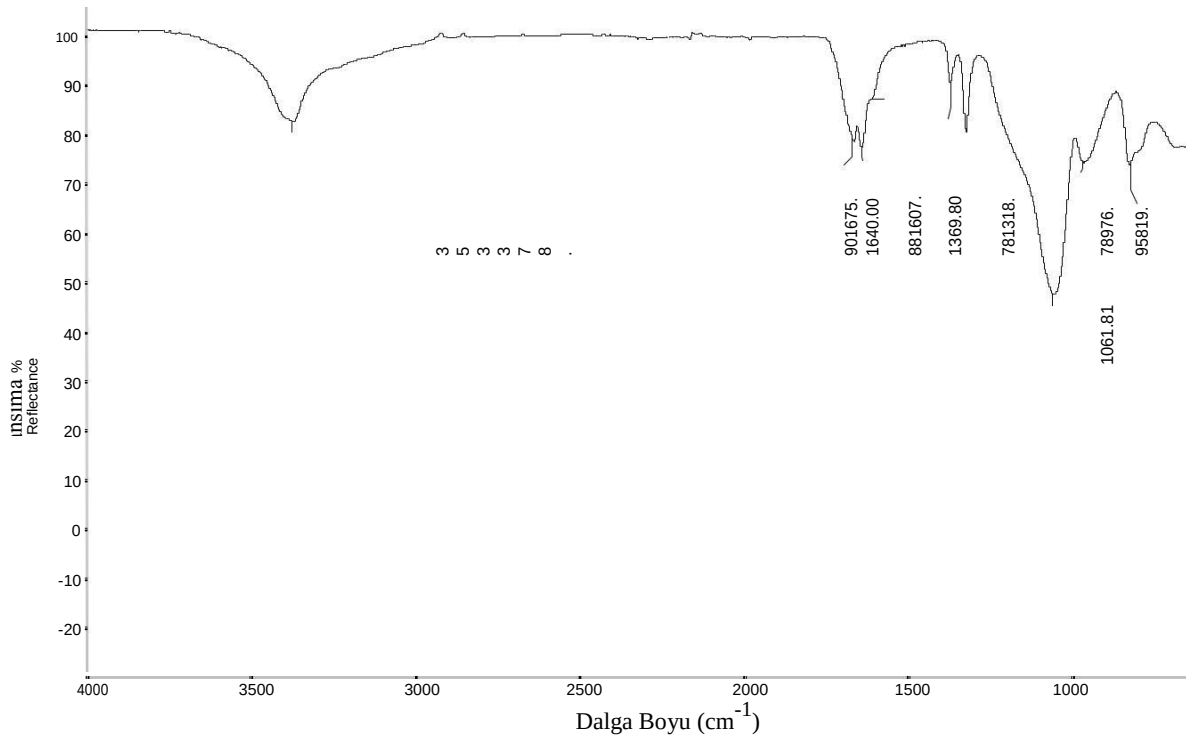
4.3. Sol-Jel Malzemelerin Karakterizasyonu

4.3.3. Sol-Jel Malzemelerin ATR-FTIR Spektrometrisi ile İncelenmesi



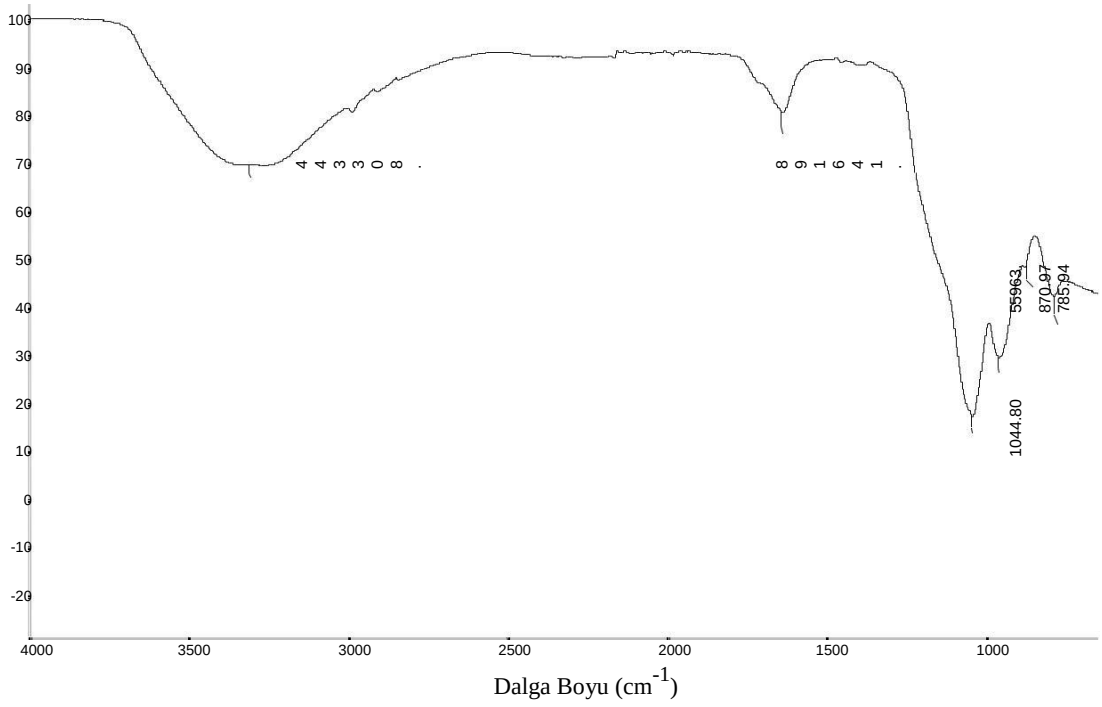
Şekil 4.1. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.

Şekil 4.1'deki $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu örnek) sol-jeline ait ATR-FTIR spektrumunda $C_6H_6MgO_7$ yapısında bulunan sitrat anyonuna ait karakteristik C=O (1634 cm^{-1}) piki, ayrıca sol-jel yapısında bulunan su ve -OH gruplarından dolayı 3300 cm^{-1} civarında şiddetli ve geniş bant gözlenmektedir. Ayrıca sentez çalışmasında kullanılan TEOS'tan dolayı sol-jel yapısında bulunan düzlem içi ve düzlem dışı Si-O gerilmeleri nedeniyle 950 cm^{-1} ve 1050 cm^{-1} civarında şiddetli pikler gözlenmektedir. Bunlara ek olarak $\sim 800\text{ cm}^{-1}$ civarında gözlenen sinyal Mg-O-Mg [62] titreşimlerine ait olup, Mg iyonlarının sol-jel yapısına başarıyla entegre edildiğini göstermektedir.



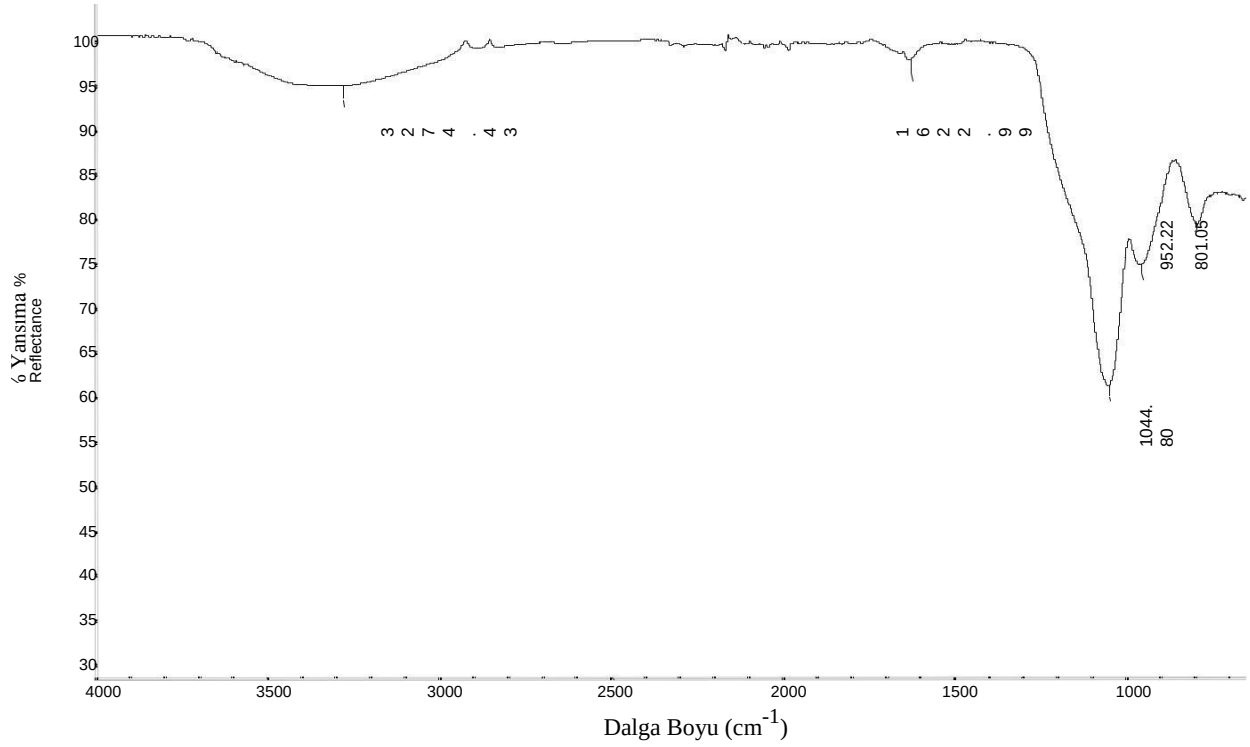
Şekil 4.2. $C_6H_6MgO_7-HNO_3@TEOS$ (3C kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.

Şekil 4.2'de bulunan $C_6H_6MgO_7-HNO_3@TEOS$ (3C kodlu örnek) sol-jeline ait ATR-FTIR spektrumunda 3400 cm^{-1} civarında sol-jel yapısında bulunan su ve -OH gruplarına ait geniş bir bant gözlenmektedir. Ek olarak 1650 cm^{-1} civarındaki ikili pik hem sitrat molekülündeki C=O ve nitrik asitten kaynaklı N=O gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. $1300-1400\text{ cm}^{-1}$ civarında gözlenen pikler TEOS hidrolizi sonrası ortaya çıkan etanol moleküllerindeki -C-H eğilmelerinden kaynaklanmaktadır. Yine TEOS'tan dolayı sol-jel yapısında bulunan düzlem içi ve düzlem dışı Si-O gerilmeleri nedeniyle 980 cm^{-1} ve 1050 cm^{-1} civarında şiddetli pikler gözlenmektedir.



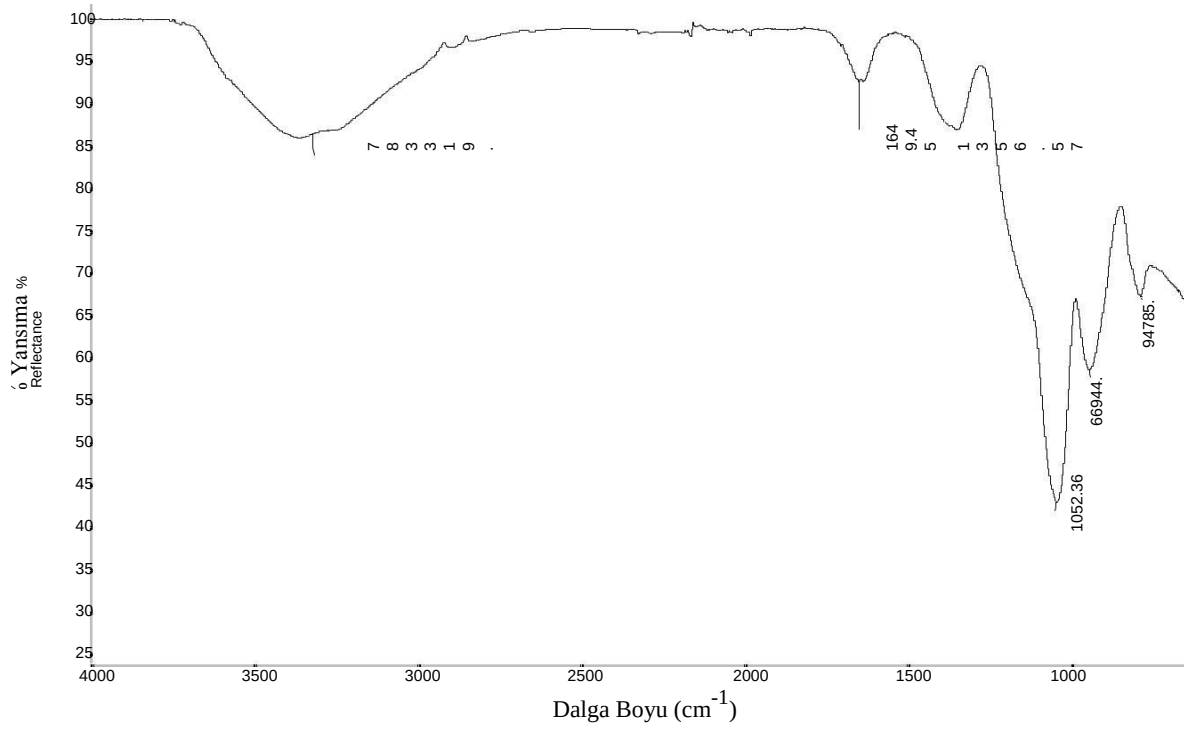
Şekil 4.3. C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS (3D kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.

Şekil 4.3'deki C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS (3D kodlu örnek) sol-jeline ait ATR-FTIR spektrumunda C₆H₆MgO₇ yapısında bulunan sitrat anyonuna ait karakteristik C=O (1641 cm⁻¹) piki, ayrıca sol-jel yapısında bulunan su ve sitrat anyonundaki -OH gruplarından dolayı 3300 cm⁻¹ civarında şiddetli ve geniş bant gözlenmektedir. Ayrıca sentez çalışmasında kullanılan TEOS'tan dolayı sol-jel yapısında bulunan düzlem içi ve düzlem dışı Si-O gerilmeleri nedeniyle 960 cm⁻¹ ve 1050 cm⁻¹ civarında şiddetli pikler gözlenmektedir.



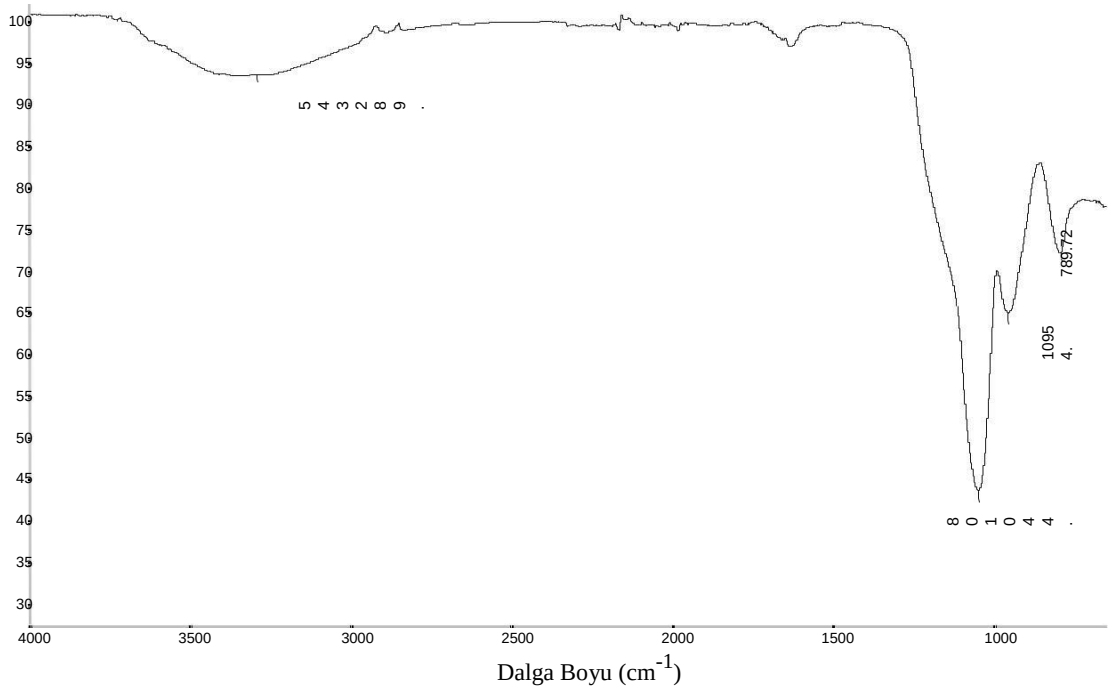
Şekil 4.4. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.

Şekil 4.4'deki C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu örnek) sol-jeline ait ATR-FTIR spektrumunda C₆H₆MgO₇ yapısında bulunan sitrat anyonuna ait karakteristik C=O (1620 cm⁻¹) pikinin şiddeti oldukça azalmıştır, ayrıca sol-jel yapısında bulunan PEG ve -OH gruplarından dolayı 3300 cm⁻¹ civarında şiddetli ve geniş bant gözlenmesine rağmen şiddetindeki azalma belirgindir. Bununla birlikte sentez çalışmasında kullanılan TEOS'tan dolayı sol-jel yapısında bulunan düzlem içi ve düzlem dışı Si-O gerilmeleri nedeniyle 950 cm⁻¹ ve 1050 cm⁻¹ civarında şiddetli pikler gözlenmektedir. -OH ve C=O piklerinin şiddetindeki azalmanın bu sol-jelin sentezi esnasında asit miktarının az kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kullanılan asit miktarının (HCl) az olması özellikle kondenzasyon basamağını yavaşlatarak PEG ve sitrat molekülerinin yapıya entegrasyonunu azaltmış ve bu sayede serbest bulunan bu yapıların yıkama işlemleri esnasında sol-jel yapısından uzaklaştırılmasına sebep olmuştur.



Şekil 4.5. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.,

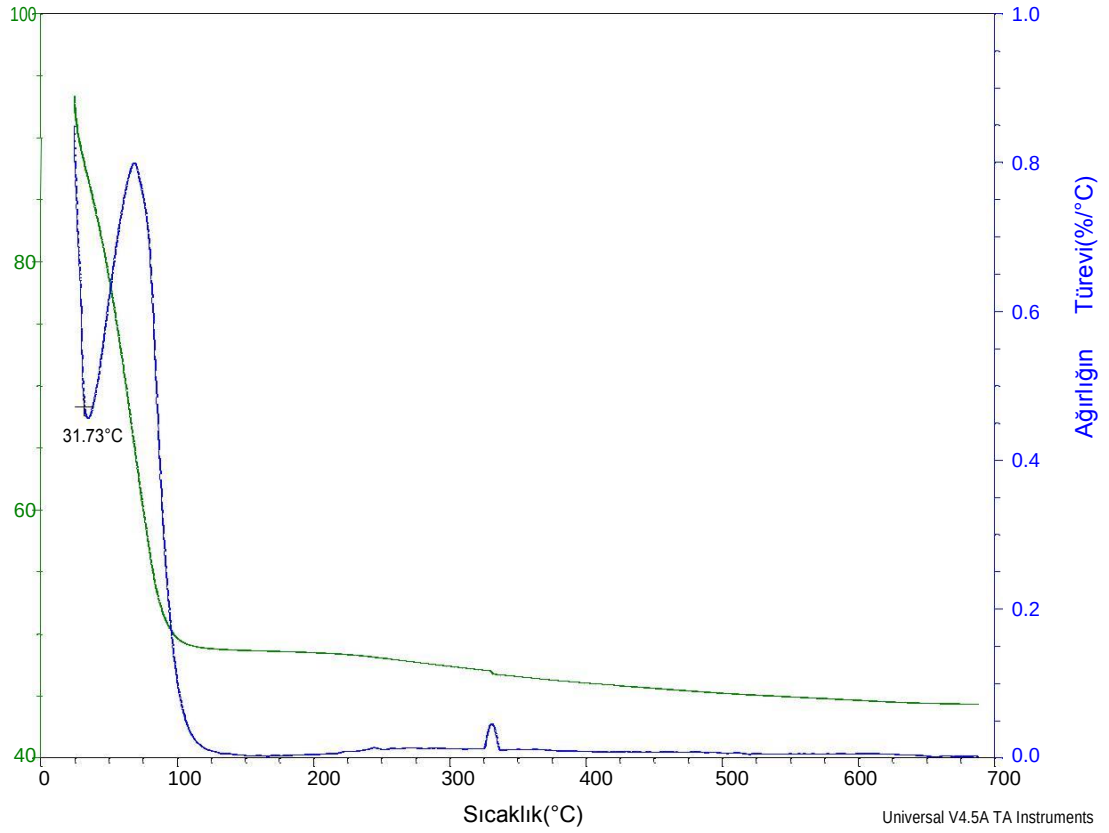
Şekil 4.5'deki C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3I kodlu örnek) sol-jeline ait ATR-FTIR spektrumunda C₆H₆MgO₇ yapısında bulunan sitrat anyonuna ait karakteristik C=O (1650 cm⁻¹) piki gözlenmektedir, ayrıca sol-jel yapısında bulunan PEG ve -OH gruplarından dolayı 3300 cm⁻¹ civarında geniş bant gözlenebilmektedir. Bununla birlikte sentez çalışmasında kullanılan TEOS'tan dolayı sol-jel yapısında bulunan düzlem içi ve düzlem dışı Si-O gerilmeleri nedeniyle 940 cm⁻¹ ve 1050 cm⁻¹ civarında şiddetli pikler yer almaktadır. -OH ve C=O piklerinin şiddetindeki azalma bu ATR-FTIR spektrumunda da gözlenmesine rağmen az miktarda kullanılan HNO₃'nin katalizör olarak HCl'ye kıyasla daha verimli olduğu ve bu piklerin şiddetindeki azalmanın C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jeline kıyasla daha az olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuç özellikle TEOS'ta bulunan etoksit gruplarının artan oranda etanol olarak ayrılması sonucu ortaya çıkan ve yaklaşık 1350 cm⁻¹ civarında gözlenen -C-H sinyallerinden de anlaşılabilmektedir.



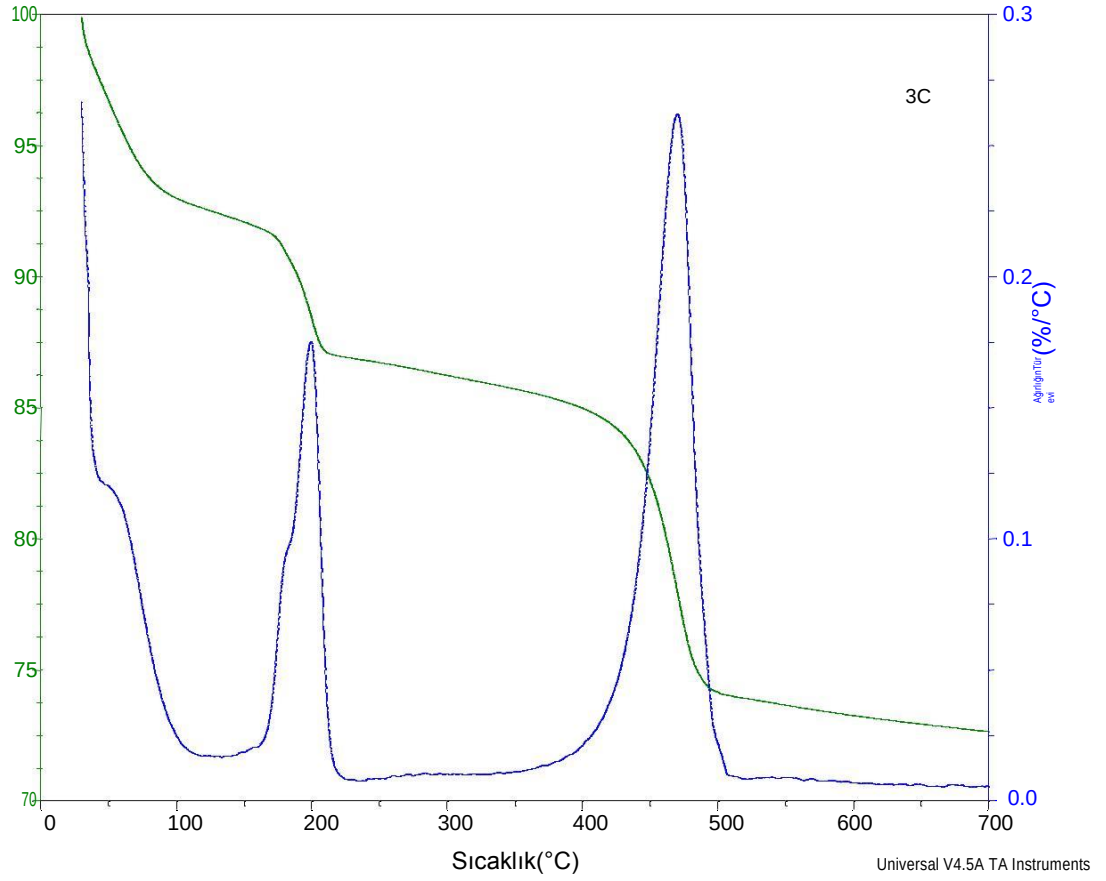
Şekil 4.6. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) ATR-FTIR Spektrumu.

Şekil 4.6.'da bulunan C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu örnek) sol-jeline ait ATR-FTIR spektrumunda da özellikle C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jeline benzer bir durum gözlenmiş olup, bu sonuçlar fosforik asit ve hidroklorik asitin, PEG içeren sol-jellerin sentezinde katalizör olarak nitrik asitten daha düşük etkinlik gösterdiklerini göstermektedir. TEOS dışında sol-jel sentez ortamına eklenen maddelerin yapıya entegrasyonundaki azalmanın C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS sol-jeli için de geçerli olduğu yapılan bu çalışma sonucunda da görülmüştür.

4.3.4. Sol-Jel Malzemelerin Termogravimetrik Analizleri

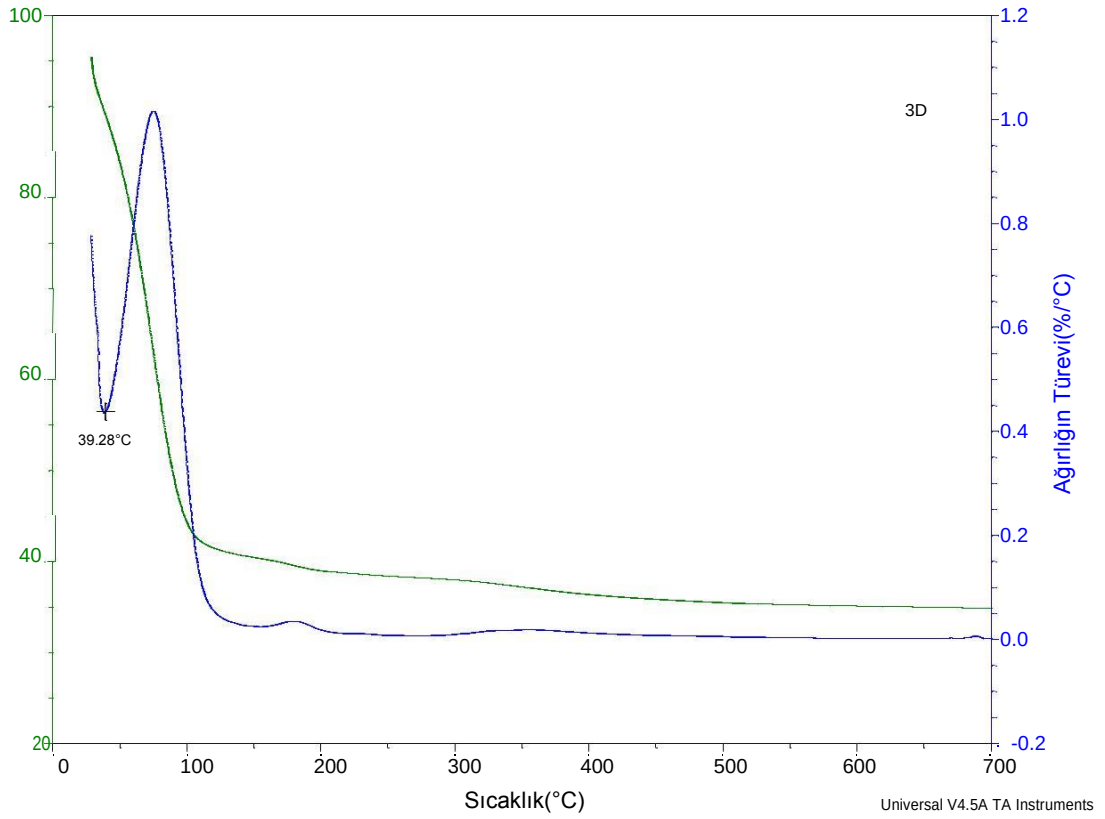


Şekil 4.7. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4$ @TEOS'un ısısal kararlılığını belirlemede kullanılan TGA termogramını göstermektedir. Oda sıcaklığından 700 °C'ye kadar ısıtılan örnekte iki basamakta değişim gözlenmiştir. 100 °C ye kadar olan ilk basamakta örnek içerisindeki su buharlaşmış bu esnada örnek, kütesinin yaklaşık % 50 sini kaybetmiştir. 350 °C ye kadar olan ikinci basamaktaki bozunma yapıda bulunan uçucu organik yapıların ısısal bozunmasından kaynaklıdır. Bu esnada kütle kaybı yaklaşık % 5 olarak gözlemlenmiştir.



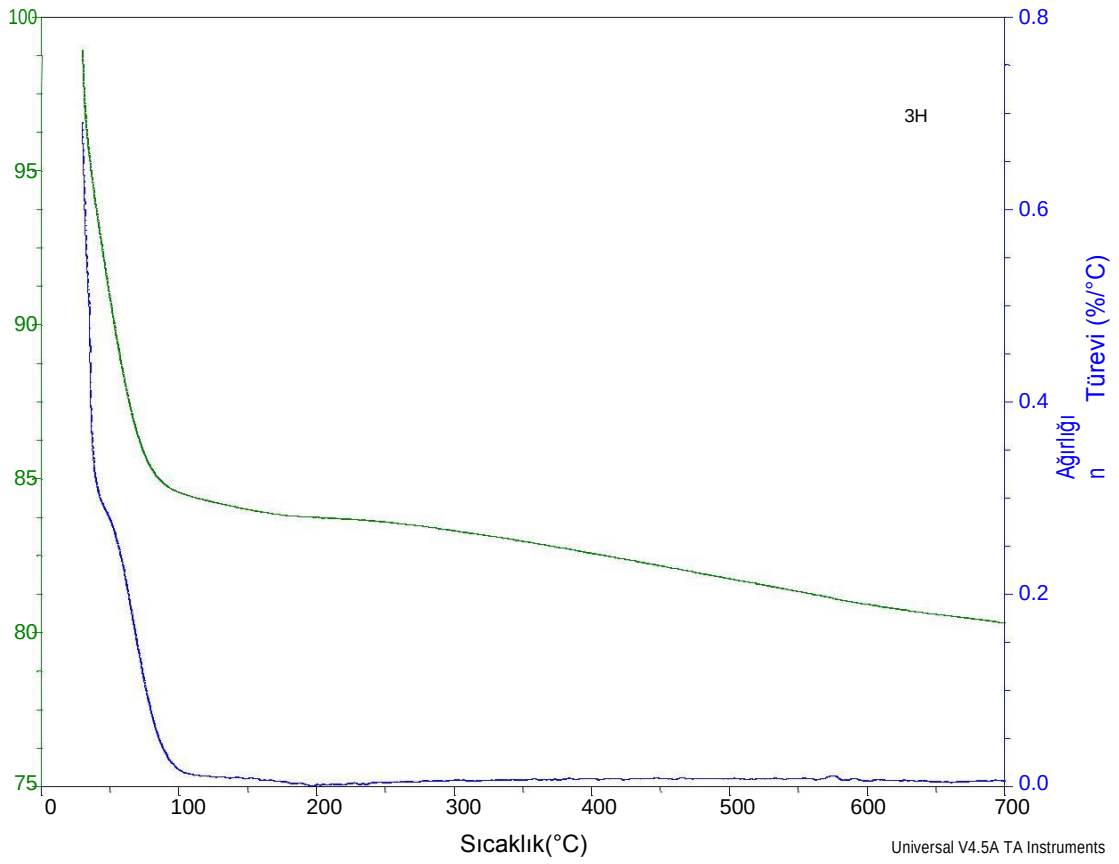
Şekil 4.8. $C_6H_6MgO_7-HNO_3$ @TEOS (3C kodlu sol-jel) Termogramı.

Oda sıcaklığında analize başlanan örnek için ısısal bozunma üç basamakta meydana gelmiştir 90 °C'ye kadar olan ilk basamak, % 8 kütle kaybına karşılık gelen dehidrasyon basamağıdır. Sonrasında 200 °C - 500 °C arasındaki değişim yapıdaki organik gruplarının uzaklaşmasıdır.



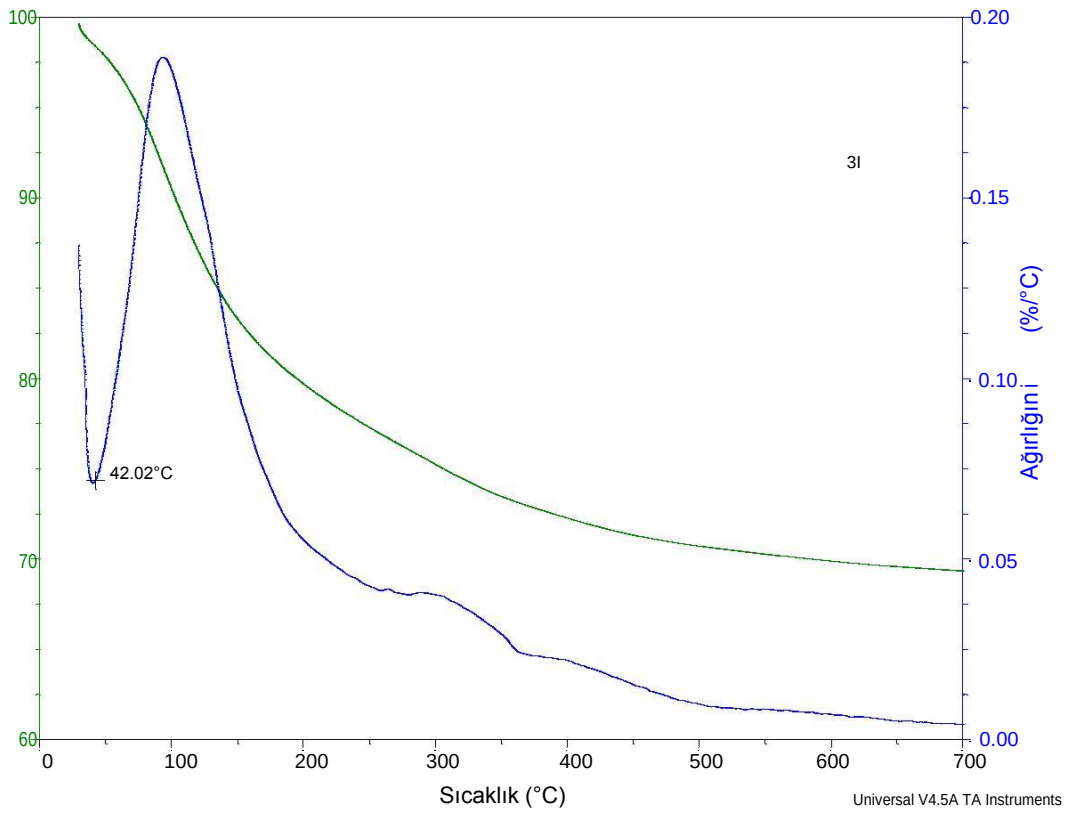
Şekil 4.9. $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ (3D kodlu sol-jel) Termogramı.

Şekil 4.9 daki termogramda $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ (3D kodlu sol-jel) malzeme $40^{\circ}C$ 'de camsı özelliklerini kaybedip vizkoz özellik kazanmaya başlamıştır. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ 'dan daha yüksek camsı geçiş sıcaklığına sahip olması 3D kodlu soljel malzemenin $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ 'a kıyasla daha fazla dallanmış yapıya sahip olması olarak yorumlanabilir. Dehidrasyonda örnek kütlesinin yaklaşık % 60'ını kaybeden sol-jel malzeme için ısısal kararlılık $200^{\circ}C$ 'den sonra başlamıştır.



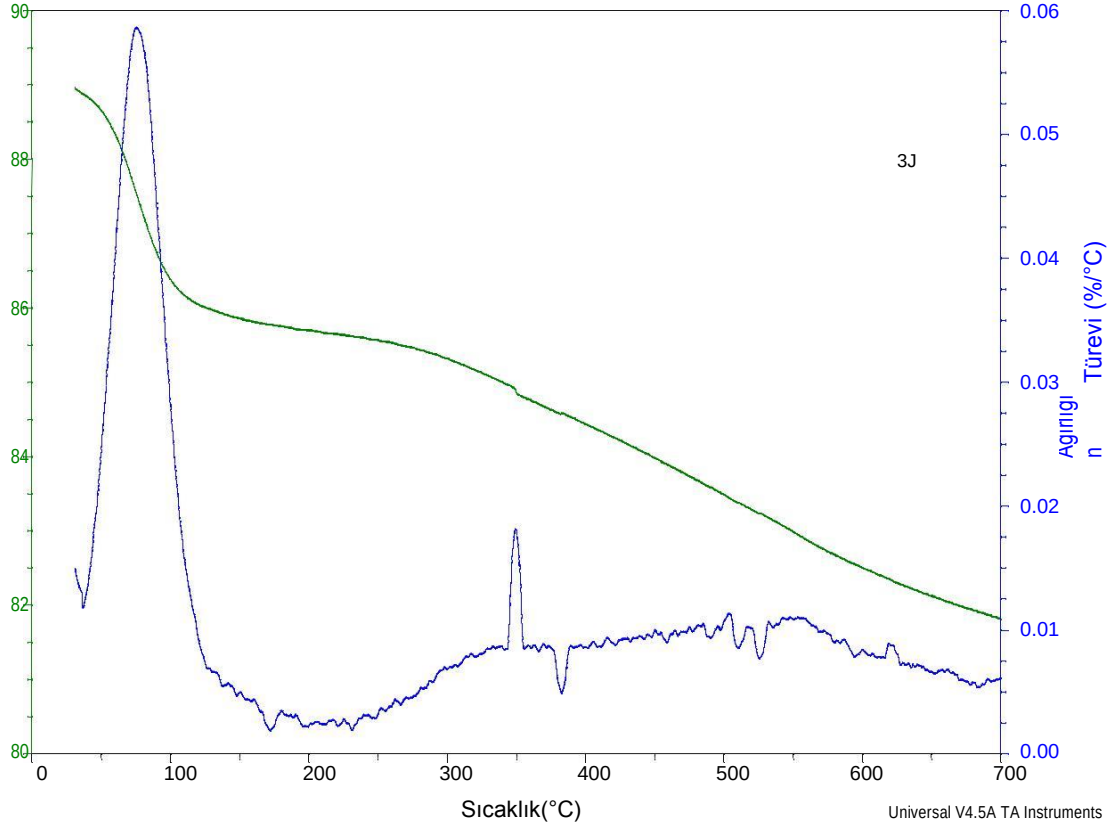
Şekil 4.10. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) Termogramı.

Poli(etilen)glikol (PEG), biyolojik olarak uyumlu olması, yüksek oranda hidrofilik olması, suda çözünürlüğü ve toksik olmaması sebebiyle biyomedikal uygulamalarda en sık tercih edilen sentetik polimerlerden biridir. Şekil 4.10'daki termogram magnezyum sitrat ve PEG'den kaynaklı 100 °C'de görülen dehidrasyon basamağındaki kütle kaybı % 15'lerdedir.



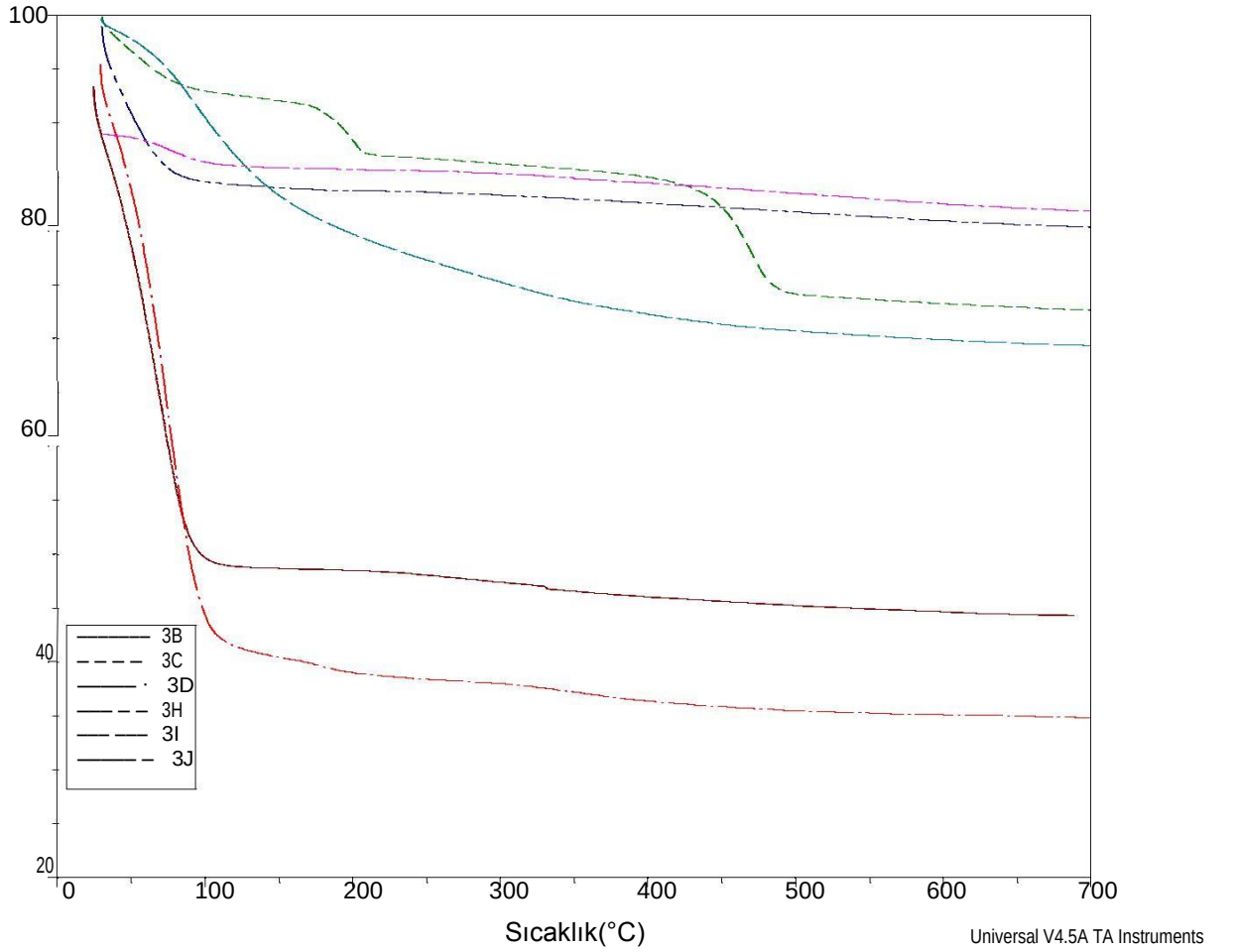
Şekil 4.11. $C_6H_6MgO_7-HNO_3-PEG@TEOS$ (3I kodlu sol-jel)Termogramı.

$C_6H_6MgO_7-HNO_3-PEG@TEOS$ için (Şekil 4.11) camsı geçiş sıcaklığı $42^{\circ}C$ 'dir. $100^{\circ}C$ 'e kadar olan ısısal bozunma sol-jelin yapısından su moleküllerinin uzaklaştığını göstermektedir.



Şekil 4.12. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4-PEG@TEOS$ (3J kodlu sol-jel)Termogramı.

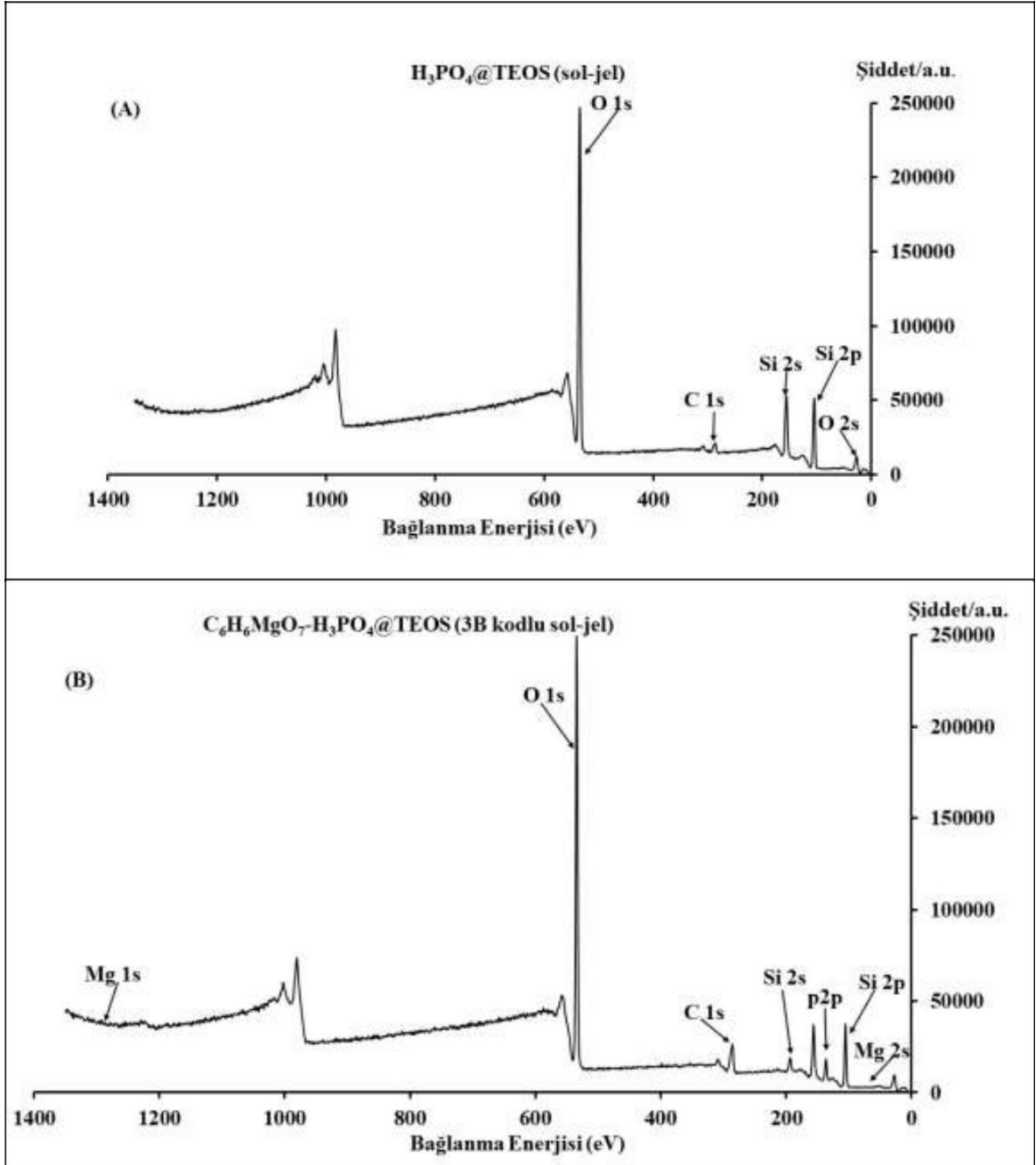
$C_6H_6MgO_7-H_3PO_4-PEG@TEOS$ için ısısal değişim (Şekil 4.12) iki basamakta meydana gelmiştir. 100 °C'ye kadar olan ilk basamakta, örnek içerisindeki suyun uzaklaşması dehidrasyon basamağını oluşturmaktadır. 350 °C civarındaki ikinci basamakta ise örnekteki diğer uçucu organik bileşenler yapıdan uzaklaşmıştır.



Şekil 4.13. Tüm Örneklerin Karşılaştırmalı Termogram Sonuçları.

Tüm sol-jel malzemeler birlikte değerlendirildiğinde (Şekil 4.13) örneklerin % 50 ila % 20 arasında kütle kaybı gösterdiği ve 100 °C'ye kadar olan kaybın örnek malzemelerin yapısındaki su ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. PEG içermeyen örneklerden $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4 @TEOS$ (3B kodlu sol-jel) ve $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ (3D kodlu sol-jel) malzemelerde magnezyum sitrattan kaynaklı kayıp 150 °C'de başlayıp 300 °C'de sonlanmaktadır. PEG içeren malzemelerde ise PEG'in varlığı kütle kaybında azalmaya neden olmuştur.

4.3.5. Sol Jel Malzemelerin XPS ile İncelenmesi



Şekil 4.14. (A)Yapısına C₆H₆MgO₇ eklenmemiş sol-jel malzemenin XPS spektrumu.

(B) C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS (3B kodlu sol-jel) XPS Spektrumu.

Katı malzemelerin yüzeylerinin kimyasal yapısı ve yükseltgenme basamakları hakkında bilgi vermek amaçlı kullanılan X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS), bu amaçla en sık kullanılan yöntemdir. Yapısına C₆H₆MgO₇ eklenmeden sentezlenmiş sol jel malzemenin yüzeyi XPS tekniği ile analiz edilmiştir. (Şekil 4.14A) Oksijenden kaynaklı O1s ve

karbondan gelen C1s tek bir tepe noktalı spektral hat meydana getirmiştir. Şekil 4.14A da görüldüğü üzere karbon için bağlanma enerjisinin pozisyonu 1s ve enerjisi ise 285 eV'dur. Oksijen için ise bağlanma enerjisi pozisyonu 1s için 550 eV'dur. TEOS'un temel piklerinden olan Si için bağlanma enerjileri 100 eV ve 180 eV olarak kaydedilmiştir. XPS spektrumuna göre numune yüzeyinde C, Si ve O bulunduğu anlaşılmakta ve C₆H₆MgO₇ eklenmeden TEOS ile sentezlenmiş sol-jele ait silikon atomları gözlenmektedir. Şekil 4.14B de gösterilen C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS (3B kodlu sol-jel) malzemenin yüzeysel yapısında şekil 4.14A dan farklı olarak, 1300 eV enerji değerinde Mg1s'den kaynaklı 150 eV ve 100 eV'da Mg2s ve Mg2p'den kaynaklı Magnezyum'a ait sinyaller gözlenmektedir. Şekil 4.14B'de yer alan XPS spektrumundan elde edilen atomic yüzde verileri Tablo 4.1'de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre 3B kodlu C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS sol-jelin yüzeyinde ve yapısında magnezyum elementleri başarıyla gözlenmiştir.

Tablo 4.1. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS (3B kodlu sol-jel) için Pik Tablosu.

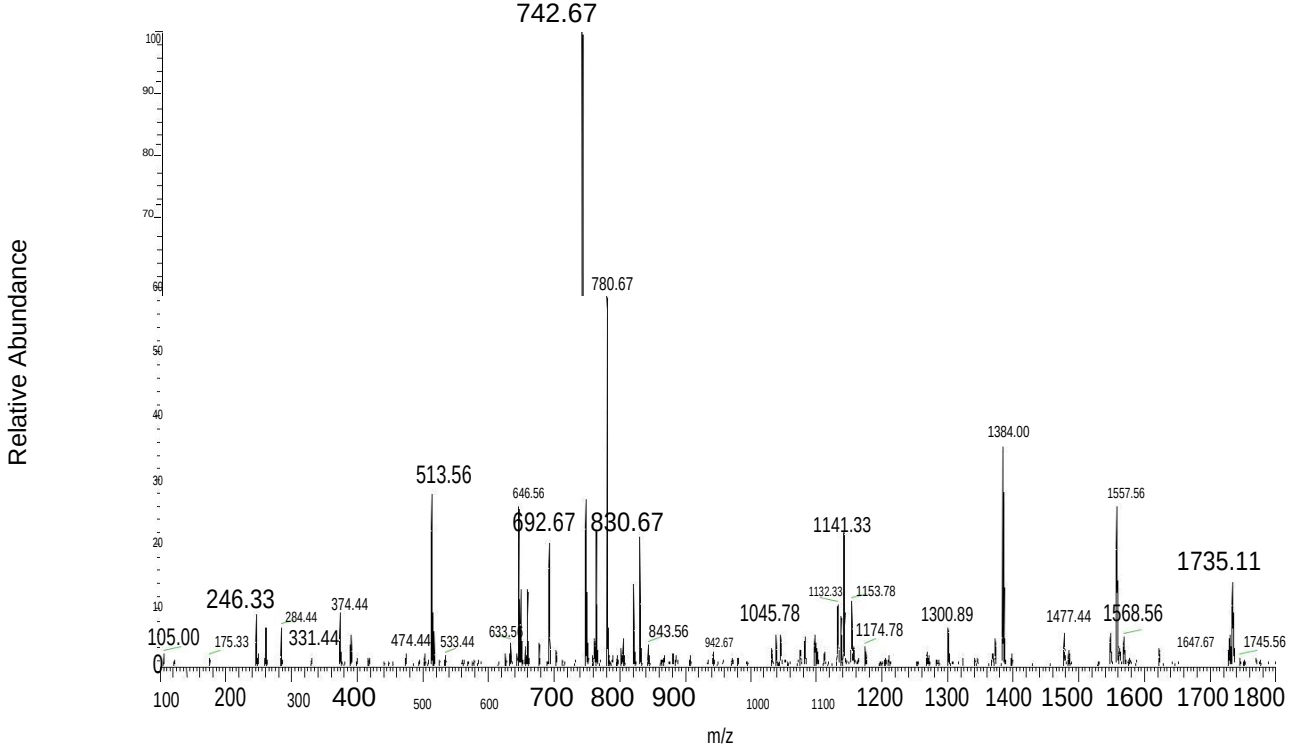
Molekül	Atomik %
O1s	57,61
Si2p	19,41
Si2s	5,97
C1s	16,13
Mg1s	0,10
Mg2s	0,21

C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS (3B kodlu sol-jel) malzeme sentezlenirken malzemeye eklenen C₆H₆MgO₇ miktarı ağırlıkça yüzde 0,3 iken, XPS analizi sonucu bu oranın yaklaşık yüzde 0,2 civarlarına düştüğü görülmektedir. Yüzde 0,1'lik kaybın nedeni zenginleştirme işlemleri öncesinde sol-jel yapısında bulunan safsızlıklardan kurtulmak amacıyla yapılan yıkamalar ve bunun sonucunda sol-jel yapısına kimyasal olarak bağlanamayan Magnezyum iyonlarının uzaklaşmasıdır. Bu şekilde geriye % 0,2 oranında Mg iyonlarının sol-jel yapısına bağlı olarak kaldığı ve bu sayede bu malzemenin zenginleştirme başarısını pozitif yönde etkilediği anlaşılmaktadır.

4.4. Sol-Jel Malzemelerle Fosfopeptitlerin Zenginleştirilmesi

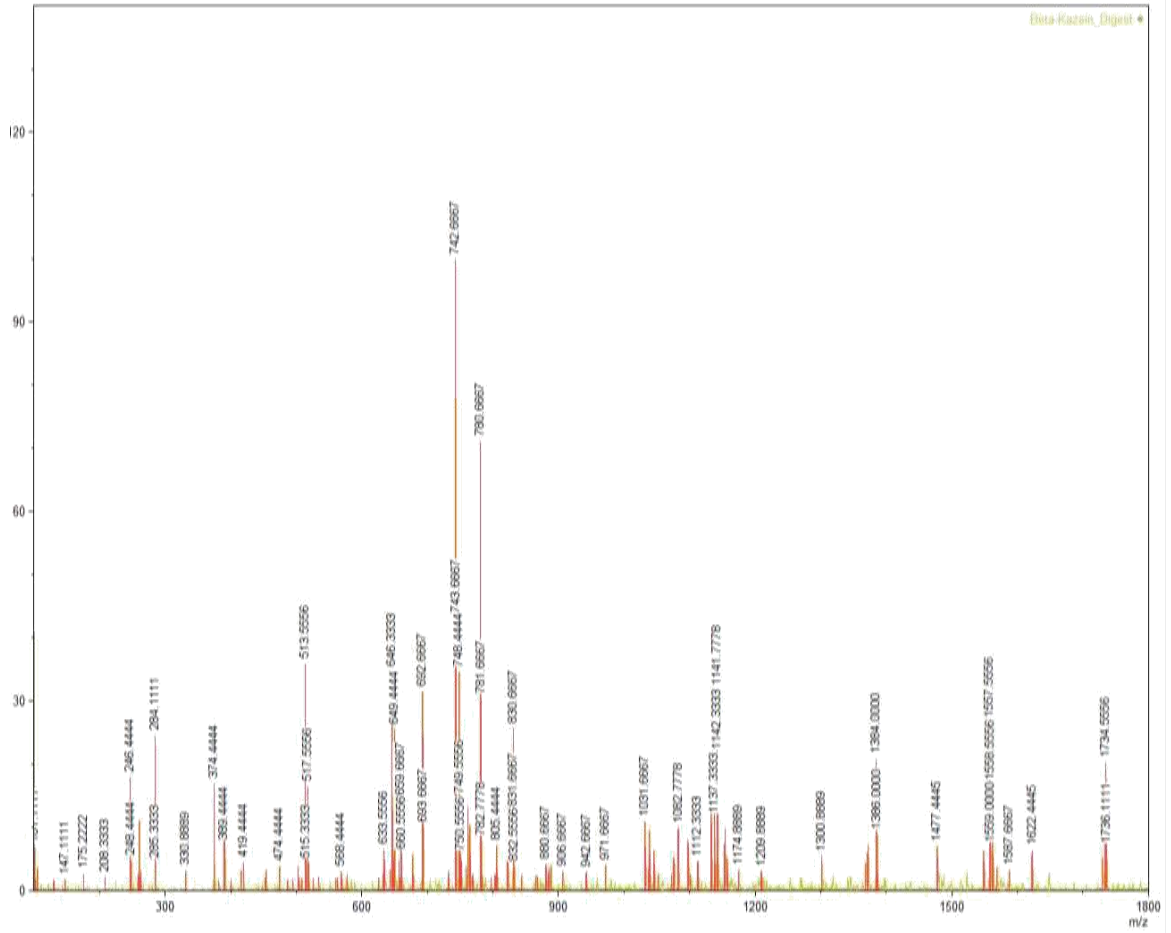
Zenginleştirme çalışmaları öncesinde ilk olarak β -kazein proteini tripsin enzimi ile parçalanarak β -kazein'e ait peptit parçaları elde edilmiştir. Bu peptit karışımı üzerinde hiçbir işlem uygulanmadan ESI kütle spektrumu elde edilmiş ve Şekil 4.15'de verilmektedir.

digest_betacasein #18 RT: 0.48 AV: 1 NL: 1.17E7
T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



Şekil 4.15. Tripsin ile Parçalanmış β -kazein'in ESI Kütle Spektrumu.

Daha sonra bu peptit karışımına ait kütle spektrumu verileri mMass yazılımına aktarılmış ve kütle spektrumu yazılım kullanılarak tekrar çizdirilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Tripsin ile Parçalanmış β -kazein'e ait kütle spektrumunun mMass yazılımında görüntülenmesi.

Bu kütle spektrumunda yer alan sinyaller yazılımın pik belirleme (peak picking) işlemiyle tablo haline getirilerek daha sonra gerçekleştirilecek fosfopeptit tarama işlemine hazır hale getirilmiştir. Tez kapsamında mMass yazılımı ile gerçekleştirilen pik belirleme işlemlerinde parametreler sinyal/gürültü oranı (S/N) 10, maksimum yük 10 ve kütle aralığı 100-1800 m/z olarak seçilmiştir. β -kazein için Uniprot (www.uniprot.org) veritabanından elde edilen amino asit dizilimi bilgileri (Şekil 4.17) kullanılarak mMass yazılımında tripsin ile “in-silico” proteolitik parçalama işlemi gerçekleştirilmiş ve teorik olarak peptit kütle/yük (m/z) değerleri belirlenmiştir.

10	20	30	40	50
MKVLILACLV	ALALARELEE	LNVPGEIVES	LSSSEESITR	INKKIEKFQS
60	70	80	90	100
EEQQTEDEL	QDKIHPFAQT	QSLVYPFPGP	IPNSLPQNIP	PLTQTPVVVP
110	120	130	140	150
PFLQPEVMGV	SKVKEAMAPK	HKEMPFKPYP	VEPFTESQSL	TLTDVENLHL
160	170	180	190	200
PLPLLQSWMH	QPHQPLPPTV	MFPPQSVLSL	SQSKVLPVPQ	KAVPYPQRDM
210	220			
PIQAFLLYQE	PVLGPVRGPF	PIIV		

Şekil 4.17. B-Kazein'in Uniprot Veritabanından Elde Edilmiş Amino Asit Dizilimi.

β -kazein için gerçekleştirilen teorik parçalama işlemleri esnasında serin, treonin ve tirozin amino asitleri için fosforilizasyon ihtimali değişken (variable) olarak seçilerek, elde edilen peptit kütle değerleri içerisinde fosfopeptitlerinde yer alması sağlanmıştır. Yine parçalama işlemleri esnasında “missed cleavage” değeri bir (1) olarak belirlenmiş, m/z değerleri tipik ESI spektrumlarına uygun şekilde çoklu yük (multiple charge) içerecek şekilde elde edilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen yazılımsal tripsin parçalaması işlemlerinin tümünde aynı yol izlenmiş, sonradan yapılacak karşılaştırma işlemleri için en uygun peptit kütle değerleri elde edilmiştir. Teorik olarak belirlenen bu peptit m/z değerleri hem fosfopeptitleri hem de fosfatlanmamış peptitleri içermektedir. Tez çalışmalarının bu kısmında, hiç bir zenginleştirme işlemi uygulanmadan ESI-MS ile deneysel olarak ölçülen β -kazein peptitlerinin m/z değerleri, yine β -kazein proteinine ait yazılımsal teorik parçalama sonucu elde edilen peptit m/z değerleriyle karşılaştırılmış ve işlem görmemiş β -kazein'e bir çok fosfopeptit sinyalinin tayin edilemediği görülmüştür (veriler gösterilmemiştir). mMass yazılımıyla gerçekleştirilen bu karşılaştırma işlemine ait ekran görüntüsü temsili olarak Şekil 4.18'de verilmektedir. Tez kapsamında daha sonra gerçekleştirilen zenginleştirme çalışmalarında da eşleşen fosfopeptit sinyallerini belirlemek amacıyla aynı yöntem uygulanmıştır. İşlem görmemiş β -kazein ile ilgili olarak yapılan karşılaştırma işlemleri sonucunda fosfopeptitlerin etkin bir şekilde gözlenememesi, bu tür çalışmalar için zenginleştirme işlemlerinin gerekliliğini ve önemini bir kez daha ortaya koymuştur.



Şekil 4.18. ESI-MS ile deneysel olarak ölçülen β -kazein peptitlerine ait m/z değerlerinin, β -kazein proteinine ait teorik parçalama sonucu elde edilmiş peptit m/z değerleriyle karşılaştırılması.

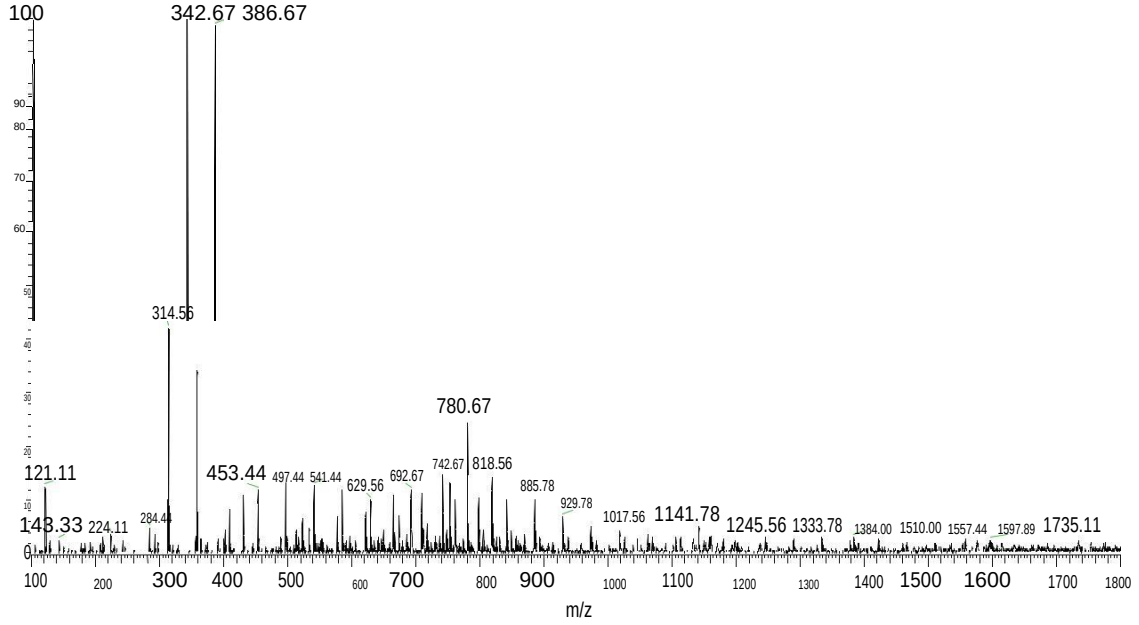
4.2.1 Sol-Jel Malzemelerle β -Kazein Peptitlerinin Zenginleştirilmesi

4.2.1.1 $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B) sol-jeli kullanılarak β -kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Zenginleştirme çalışmaları kapsamında ilk olarak, sentezlenen $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ tipi sol-jel kullanılmış ve sadece β -kazein proteinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen peptit karışımı, bu sol-jellerle deneysel kısımda anlatıldığı şekilde muamele edilmiştir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerinin ardından elde edilen zenginleştirilmiş peptit çözeltisi ESI kütle spektrometresi ile analiz edilmiş, bu analizden elde edilen kütle spektrumu Şekil 4.19’da verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ türündeki 3B kodlu sol-jelin fosfopeptit zenginleştirme konusunda oldukça başarılı olduğu anlaşılmaktadır. Tez kapsamında sentezlenen diğer tipteki sol-jellere kıyasla çok daha başarılı fosfopeptit zenginleştirme kapasitesine sahip bu sol-jel ile gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında önemli farklılıklara rastlanmıştır. Özellikle XPS spektroskopisi çalışmalarında $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jelinin yapısında daha belirgin

bir şekilde Mg iyonları içerdiği görülmüştür. Sol-jel sentez çalışmaları esnasında sentez ortamına oldukça az miktarda eklenen $C_6H_6MgO_7$ (magnezyum sitrat) bileşiğinin sadece bu sol-jel yapısına başarılı bir şekilde entegre edilebildiği XPS spektrumlarından da anlaşılmaktadır. $C_6H_6MgO_7$ bileşiğinin tez kapsamında uygulanan şekliyle (ağırlıkça %3) düşük miktarda eklenmesinin nedeni sol-jel oluşum tepkimeleri esnasında ana omurgayı oluşturan $-Si-O-Si-$ bağlarının oluşumunu engellemeden sol-jel ağ yapısının oluşmasını sağlayabilmektir. Sentez ortamında çok daha yüksek miktarlarda $C_6H_6MgO_7$ eklendiğinde sol-jel ağ yapısı oluşumunda sorunlar meydana gelmiş, üretilen sol-jel tipindeki partiküllerin zaman içerisinde çözünerek dağıldıkları tecrübe edilmiştir. Bu nedenle $C_6H_6MgO_7$ miktarı düşük tutularak, Magnezyum iyonlarının fosfopeptit zenginleştirme konusundaki başarıları test edilmeye çalışılmıştır. Magnezyum katkılama konusunda en iyi sonucun elde edildiği $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ tipindeki sol-jelin bu özelliğinden dolayı fosfopeptit zenginleştirme açısından da en iyi sonucu verdiği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte bu sol-jel yapısında XPS spektrumlarında da gözlenen, sentez aşamasında asit olarak H_3PO_4 (fosforik asit) kullanılmasında kaynaklanan Fosfat (P) atomlarının bu sol-jel türünün fosfopeptit zenginleştirme performansına olumlu katkı yaptığı düşünülmektedir. Özellikle benzer bir Lewis yapısına sahip olan sol-jel içerisindeki P atomları ve peptitlerin fosfat gruplarının uyumlu bir kimyasal çevre oluşturacak şekilde bir araya gelmelerinin sağlandığı düşünülmektedir. Asit ve bazlık olarak birbirilerini çok fazla etkilemeyen bu benzer kimyasal koşulların en azında Mg iyonları ve fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşimleri etkilemediği ve bu şekilde Pearson asit ve baz teorisinde ifade edildiği şekliyle bu gruplar arasındaki etkileşimlerin gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Fosforik asit dışında farklı asitlerin kullanıldığı sol-jellerde benzer zenginleştirme başarısının elde edilememesinin temel nedenlerinden bir tanesinin bu durum olduğu değerlendirilmiştir. Tüm bunlara ek olarak TGA ölçümleri neticesinde $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ yapısında etüvde gerçekleştirilen kurutma çalışmalarına rağmen, yüksek oranda su bulunduğu görülmüş, bu yapısal özellik zenginleştirilecek peptitlerin içinde bulunduğu sulu çözeltinin sol-jel içerisine daha kolay penetre olmasını sağlayacak, uygun hidrofilik koşulları oluşturmuştur. Bu sayede çok daha kolay biçimde sol-jel yapısındaki fonksiyonel gruplarla buluşan fosfopeptitler daha yüksek bir kapasiteyle zenginleştirilebilmiştir.

3B_betacasein #25 RT: 0.68 AV: 1 NL: 3.62E6
T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



Şekil 4.19. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β -kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Daha önceki çalışmada olduğu gibi bu spektrumda yer alan veriler mMass yazılımına aktarılarak m/z değerleri liste haline getirilmiş, bu listelerdeki m/z değerleriyle teorik peptit kütle değerleri karşılaştırılarak eşleşen (match) fosfopeptitler (Tablo 4.2) belirlenmiştir. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jeli kullanılarak elde edilen fosfopeptit eşleşme oranı % 38 olarak bulunmuştur.(Ek-1, Şekil 4)

Tablo 4.2. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-Jel) İçin β -Kazein Eşleşme Listesi.

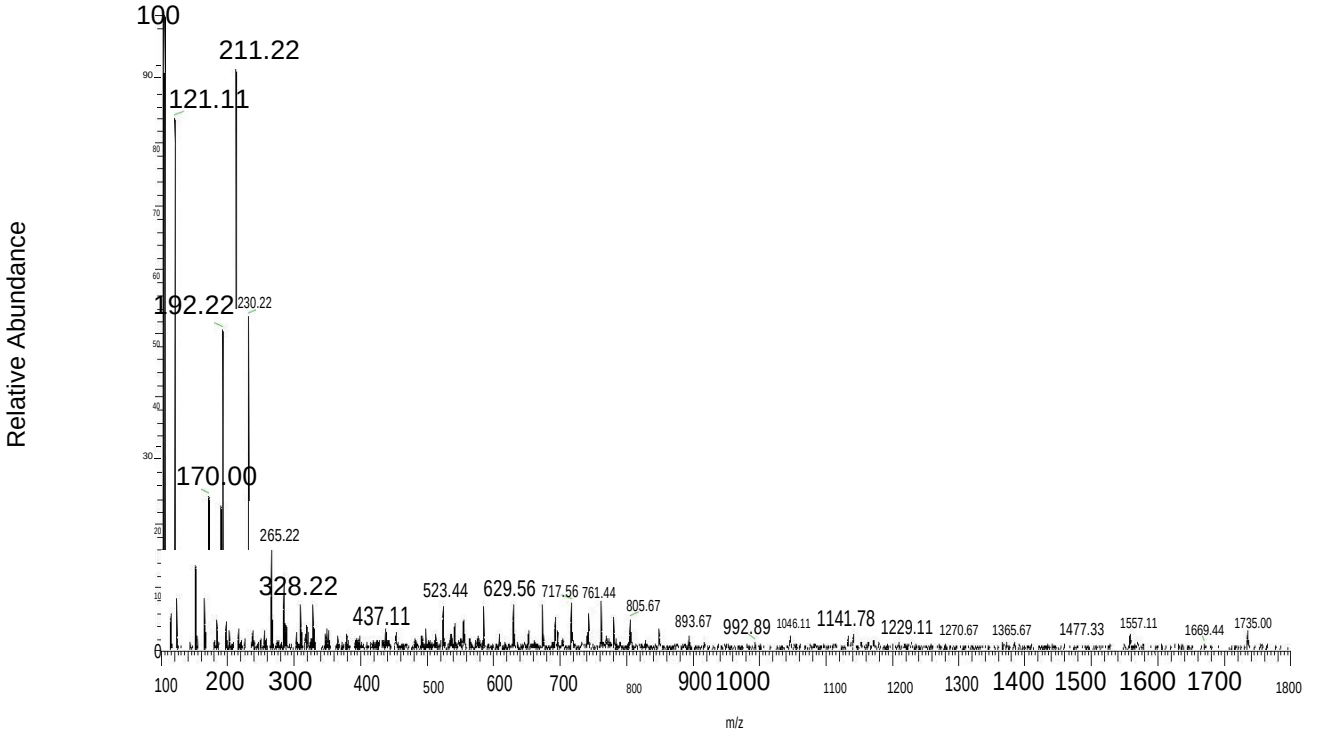
Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilim (sequence)
452,6953	9	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
627,444	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
782,2798	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [1xP*]
343,2829	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
387,7086	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [2xP*]
452,4996	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [3xP*]
649,0899	5	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
1161,111	3	k.FQSEEQQTEDELQDK.i [2xP*]
101,2728	5	k.FQSEEQQTEDELQDKIHPFAQTQSLVYPFPGPIPNSLPQNIPPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]

536,2042	4	k.FQSEEQQTDELQDKIHHPFAQTQSLVYPFPGPIPNLSPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [8xP*]
665,488	8	k.IHPFAQTQSLVYPFPGPIPNLSPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [6xP*]
1064,177	5	k.IHPFAQTQSLVYPFPGPIPNLSPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
1160,136	5	k.IHPFAQTQSLVYPFPGPIPNLSPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [5xP*]
1409,935	4	k.IHPFAQTQSLVYPFPGPIPNLSPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [6xP*]
743,8624	8	k.IHPFAQTQSLVYPFPGPIPNLSPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [2xP*]
753,8582	8	k.IHPFAQTQSLVYPFPGPIPNLSPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [3xP*]
102,2589	10	k.EMPFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
748,3698	1	k.EMPFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [1xP*]
781,737	10	k.EMPFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [11xP*]
797,4036	9	k.EMPFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [12xP*]
797,7303	10	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
805,7269	10	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [11xP*]
841,8293	9	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
859,5996	9	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
1150,607	7	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQK.a [3xP*]
692,8086	10	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQK.a [10xP*]
885,7505	8	k.AVPYPQR.d [1xP*]
1180,665	6	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xPhospho]
818,7437	9	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQK.a [3xP*]
1132,349	7	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQK.a [10xP*]
342,8474	9	k.AVPYQQRDMPIQAFLLYQEPVLPVR.g [1xP*]

*P = Fosfopeptit

4.2.1.2 C₆H₆MgO₇ -HNO₃@TEOS (3C) sol-jeli kullanılarak β -kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Zenginleştirme çalışmalarında kullanılan diğer bir sol-jel olan C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS tipi sol-jel de β -kazein proteinin tripsin ile parçalanması sonucu elde edilen peptit karışımlarıyla muamele edilmiştir. Zenginleştirme işlemlerinin ardından elde edilen peptit çözeltisi ESI kütle spektrometresi ile analiz edilmiş, bu analizden elde edilen kütle spektrumu Şekil 4.20’de verilmiştir. Bunun sonucunda da yapısı gereği hidrofilik ortamları seven peptitler C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS sol-jelin bulunan fonksiyonel gruplar ile daha az etkileşimde bulunmuş ve C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS sol-jeli kullanılarak elde edilen fosfopeptit eşleşme oranı hem fosfopeptitleri hem de fosfatlanmamış peptitleri içeren mMass yazılımında verilerin matematiksel olarak hesaplanması sonucu % 28 olarak bulunmuştur (Ek-1, Şekil 6). Fosfopeptit tayin yöntemlerinden oldukça önemli sırada bulunan ESI kütle spektromerisinde, analiz ortamında HNO₃ ya da H₂PO₄ bulunması analiz esnasında iyonlaşmayı ve fosfopeptitlerin tespitini kolaylaştırdığı bilinmektedir [63]; fakat yüzey aktivitesini ve morfolojisini değiştirmek amacıyla yapısına HNO₃ (nitrik asit) eklenerek sentezlenen sol-jelin H₃PO₄ eklenerek sentezlenen sol-jele oranla fosfopeptit tutma kapasitesi daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi olarak ta yapısında fosfat grubu bulunan peptitleri fosfat içeren ortamları tercih etmesi sayılabilir.



Şekil 4.20. C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS (3C kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Daha önceki çalışmada olduğu gibi bu spektrumda da yer alan veriler mMass yazılımına aktararak m/z değerleri liste haline getirilmiş, bu listelerdeki m/z değerleriyle teorik peptit kütle değerleri karşılaştırılarak eşleşen fosfopeptidler (Tablo 4.3) belirlenmiştir. Yapılan TGA karakterizasyon çalışmalarında C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS (3B) sol-jeline kıyasla, HNO₃ eklenerek sentezlenen C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS (3C) sol-jelinin yapısındaki su oranı daha az olduğu görülmüştür. Bu nedenle kimyasal yapısının daha az hidrofilik olduğu değerlendirilen C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS sol-jelinin sulu çözeltiyi daha az adsorplayarak fosfopeptit zenginleştirmede daha az başarı gösterdiği anlaşılmaktadır.

Tablo 4.3. C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS (3C kodlu sol-jel) İçin β -Kazein Eşleşme Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilim (sequence)
497,121	9	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [5xP*]
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
309,0553	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [1xP*]
317,0519	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [2xP*]
325,0486	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [3xP*]

349,0385	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
541,0761	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [3xP*]
784,8527	10	k.FQSEEQQTDELQDKIHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [7xP*]
564,5784	10	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
675,4838	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
828,9564	7	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [6xP*]
763,854	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSKVK.e [7xP*]
781,737	10	k.EMPFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
805,7269	10	k.EMPFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [12xP*]
806,2888	9	k.EMPFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [2xP*]
850,7145	9	k.EMPFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
652,8254	10	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [2xP*]
692,8086	10	k.YPVEPFTESSQLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
102,0529	9	k.AVPYPQR.d [1xP*]
114,6836	8	k.AVPYPQR.d [1xP*]
316,66	10	k.AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVR.g [2xP*]
284,1481	8	r.DMPIQAFLLYQEPVLPVR.g [1xP*]

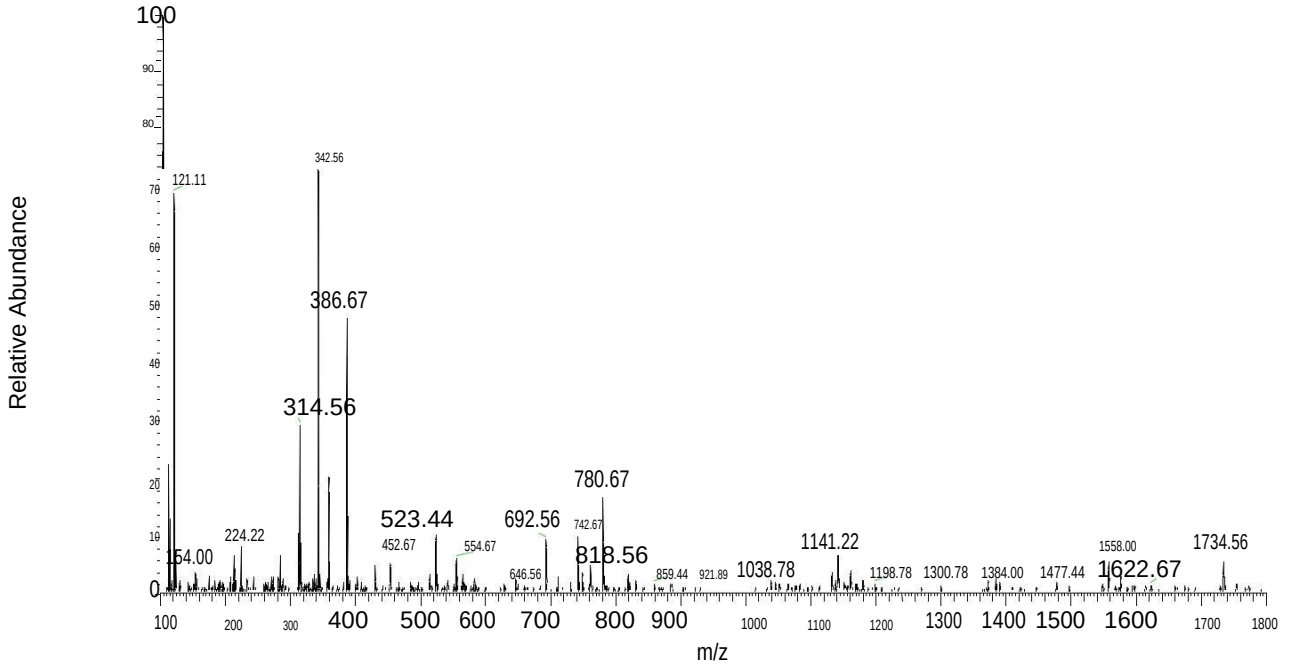
*P= Fosfopeptit.

4.2.1.3. C₆H₆MgO₇ -HCl@TEOS (3D) sol-jeli kullanılarak β-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Hücrel protein çalışmalarında önemli bir yeri olan fosfopeptitler için zenginleştirme çalışmalarında kullanılan sol-jellerden C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS (3D) sentezi için asit katalizörü olarak HCl kullanılmıştır. Sentez ve yıkama işlemlerinin ardından kurutulan sol-jel zenginleştirme çalışmalarında tripsin enzimi ile parçalanarak elde edilmiş sadece β-kazein peptitleri içeren çözeltiyle deneysel kısımda anlatıldığı şekilde etkileştirilmiştir. Bu işlemlerin ardından elde edilen zenginleşmiş çözelti ESI kütle spektrometrisi ile analiz edilmiş ve sonuç Şekil 4.21’de verilmiştir. C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS sol-jeli kullanılarak elde

edilen peptit sinyallerinin m/z değerleri mMass yazılımına aktarılmış ve daha önceki çalışmalarda detayları açıklanan karşılaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ sol-jeli kullanıldığında fosfopeptit eşleşme oranı % 29 (Ek-1, şekil 8) olarak bulunmuştur. Eşleşen fosfopeptitlere ait bilgiler Tablo 4.4'te verilmektedir. Yapılan karakterizasyon çalışmalarından TGA termogramına bakıldığında dehidrasyon basamağında örnek kütlesinin yaklaşık % 60 nın kaybolduğu görülmektedir. Su içeriğine bağlı olarak hidrofilik yapı zellikleri $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B) sol-jeliyle benzer olduğu görülen $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ sol-jeli fosfopeptit zenginleştirme açısından $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ ile aynı başarıyı göstermemiştir. Bunun en önemli nedeninin, asit katalizörü olarak HCl kullanılmasıyla farklı tipte sol-jel yapısının oluşması ve Mg iyonlarının kimyasal yapıya entegrasyonun yeterince sağlanamaması olarak açıklanabilir. Bu sol-jel kullanılarak gerçekleştirilen XPS alışmalarında, Mg iyonlarının bu sol-jel yüzeyinde yeterli yoğunlukta olmadığı görülmüştür (veriler gösterilmemiştir). Ayrıca $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jelinde yapı içerisinde yer alan fosforik asitten kaynaklı fosfat gruplarının zenginleştirmeye olan pozitif etkisi, sentez esnasında HCl asiti kullanılan bu sol-jel tipinde bulunmamaktadır. Bu durumda $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ sol-jelinin zenginleştirme performansını etkilemiştir.

3D_betacasein #108 RT: 3.04 AV: 1 NL: 1.87E6
T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



Şekil 4.21 C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS (3D kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Tablo 4.4. C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS (3D kodlu sol-jel) İçin Fosfopeptit Eşleşme Listesi.

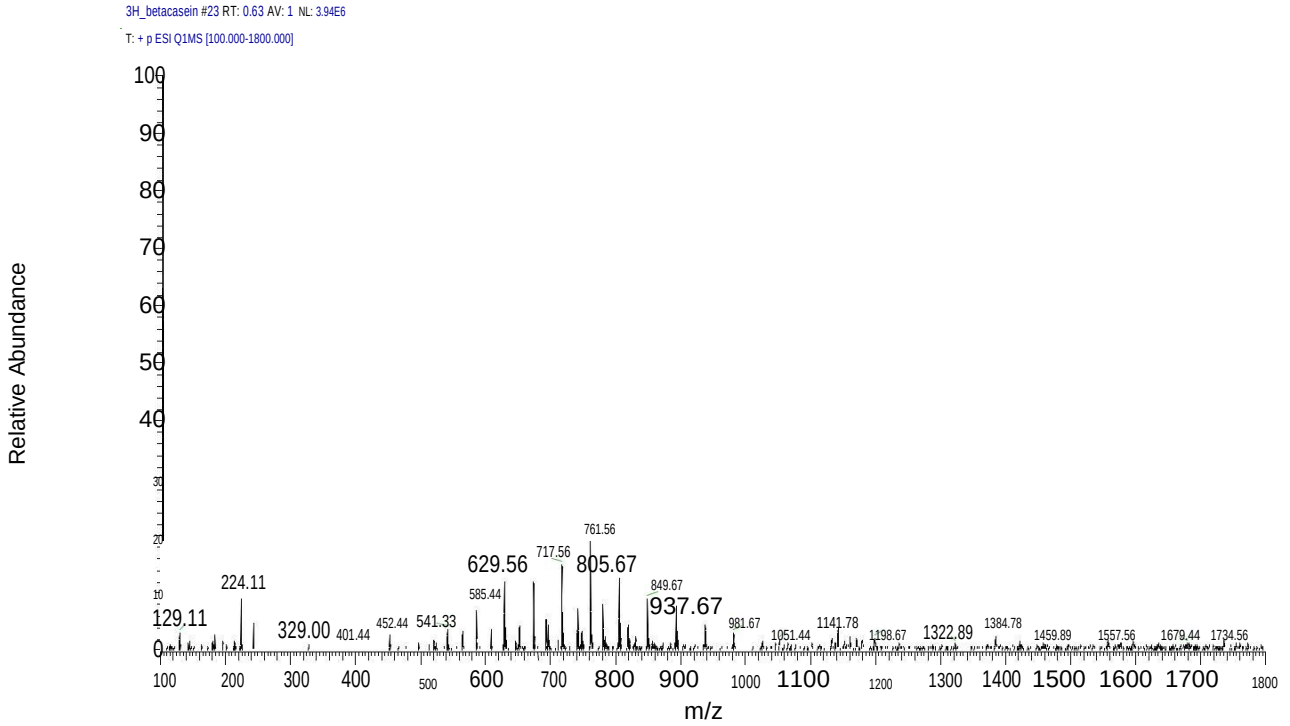
Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilim (sequence)
1137,255	4	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
313,5163	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
742,2966	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
762,2882	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [5xP*]
782,2798	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
387,7086	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
452,4996	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [2xP*]
554,4038	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
1161,111	3	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
271,1231	9	k.IEKFAQSEEQQQTEDELQDK.i [1xP*]
359,7229	7	k.IEKFAQSEEQQQTEDELQDK.i [2xP*]
207,0894	10	k.FQSEEQQQTEDELQDK.i [1xP*]
215,086	10	k.FQSEEQQQTEDELQDK.i [2xP*]
344,4775	6	k.FQSEEQQQTEDELQDK.i [1xP*]
760,8628	10	k.FQSEEQQQTEDELQDKIHFAQTQSLVYPFPGPIPNLQNIPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
818,6358	9	k.FQSEEQQQTEDELQDKIHFAQTQSLVYPFPGPIPNLQNIPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]

1132,21	7	k.FQSEEQQTDELQDKIHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQPNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [8xP*]
564,5784	10	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQPNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
1160,136	5	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQPNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [6xP*]
743,8624	8	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQPNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [5xP*]
1141,596	5	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQPNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [2xP*]
749,7505	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [5xP*]
781,737	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
692,8086	10	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
1140,682	6	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [6xP*]
760,9599	10	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQK.a [6xP*]
316,66	10	k.AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [2xP*]
284,1481	8	r.DMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [1xP*]

*P= Fosfopeptit.

4.2.1.4. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H) sol-jeli kullanılarak β-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Peptit karışımları içerisinde miktarı son derece az olan fosfopeptitleri daha kolay bir şekilde tayin edebilmek amacıyla farklı tipte malzemelerin sentezlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla sentez çalışmalarında sol-jel yapısının hidrofilik özelliklerini ve gözenekliliklerini arttırmak maksatıyla poli(etilen glikol) PEG (mw ~600) içeren sol-jeller sentezlenmiştir. Bu tipte üretilen sol-jellerden bir tanesi de jelleşme basamağında katalizör olarak HCl kullanılan C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jelidir. PEG içeren bu sol-jel türünde öncelikle model protein olan β-kazein'den elde edilen peptit karışımıyla etkileştirilmiş ve zenginleştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Elde edilen çözelti ESI-MS ile analiz edilerek kütle spektrumu Şekil 4.22'de verilmiştir. Kütle spektrumundan mMass yazılımına aktarılan veriler işlenerek teorik β-kazein sinyalleriyle karşılaştırılmış ve C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jeli için (Ek-1, Şekil 10.) eşleşme oranı % 20 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.22. $C_6H_6MgO_7$ -HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β -kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Eşleşen fosfopeptitlerin listesi Tablo 4.5’te verilmektedir. Sentezlenen bu sol-jel türünün TGA termogralarından yapıda bulunan PEG (mw ~600) nedeniyle daha hidrofilik olması ve daha çok su içermesi beklenirken bu durum gözlenmemiştir. Bu sonuç yapıya entegre olması beklenen PEG moleküllerinin kimyasal olarak bağlanmadığını ve yıkama işlemleri esnasında sol-jel yapısından uzaklaştıklarını göstermektedir. Benzer durum FTIR spektrumlarında da gözlenmiş olup baskın PEG varlığını gösteren sinyallere rastlanmamıştır. PEG eklenmesinin istenilen hidrofilik etkiyi yaratamamasına ek olarak, yapısal olarak $C_6H_6MgO_7$ bileşiğinin yapıya yeterli oranda entegre olamamasına da neden olmuştur. Bu sonuçlar bu sol-jel tipinin fosfopeptit zenginleştirmedeki düşük performansının ana nedenleri arasındadır.

Tablo 4.5. $C_6H_6MgO_7$ -HCl-PEG@TEOS (3H kodlu Sol-Jel) İçin β –Kazein Eşleşme Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
782,2798	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
452,4996	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [2xP*]
541,0761	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [3xP*]
554,4038	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]

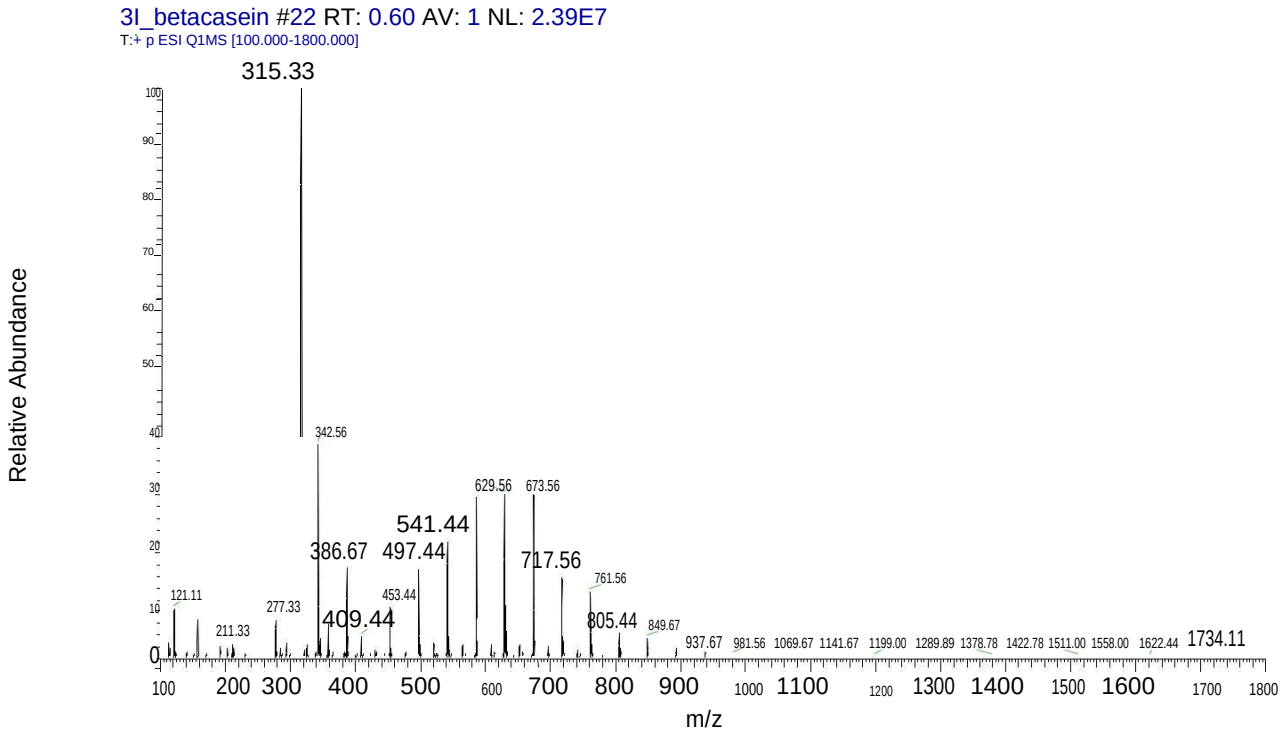
697,0697	5	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
1161,111	3	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
207,0894	10	k.FQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
818,6358	9	k.FQSEEQQTDELQDKIHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
564,5784	10	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
609,4271	9	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSK.v [2xP*]
653,8529	9	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSK.v [7xP*]
675,4838	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
587,2948	10	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSKV.e [4xP*]
652,4378	9	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSKV.e [4xP*]
781,737	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSQSK.v [9xP*]
805,7269	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSQSK.v [12xP*]
806,2888	9	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSQSK.v [2xP*]
850,7145	9	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSQSK.v [7xP*]
692,8086	10	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSQSK.v [7xP*]
1140,682	6	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSQSK.v [6xP*]
818,7437	9	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSQSKVLPVPQK.a [3xP*]
1132,349	7	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSQSKVLPVPQK.a [10xP*]
102,0529	9	k.AVPYPQR.d [1xP*]
454,0327	5	r.DMPIAFLLYQEPVLPVR.g [1xP*]

*P= Fosfopeptit.

Tüm bunlara ek olarak oldukça hassas bir ölçüm yöntemi olan ESI-MS çözelti ortamında çok düşük miktarda bulunan kimyasal bileşenleri tayin edebilmektedir. Yıkama işlemlerinde PEG moleküllerinin büyük bir çoğunluğunun C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jel yapısından uzaklaşmasına rağmen, yapıda kalan PEG molekülleri zenginleştirme çözeltilerine salınmaya devam etmiş ve ESI-MS ölçümlerinde kirliliklere neden olmuştur. PEG moleküllerinden kaynaklanan bir takım sinyaller C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jeli kullanılarak elde edilen kütle spektrumunda da (Şekil 4.22) gözlenmektedir. Bu nedenle veriler işlenmek maksatıyla mMass yazılımına aktarıldığında, özellikle deneysel ve teorik verilerin karşılaştırma basamaklarında PEG sinyallerinden dolayı olumsuzluklarla karşılaşmış ve arzu edilen fosfopeptit eşleşme değerleri yakalanamamıştır. Bu sonuç kütle spektrometrik iyonlaşma verimi oldukça yüksek olan PEG gibi maddelerin sol-jel malzemelerin yapısına eklendiği durumlarda, yapısal entegrasyonun çok yüksek düzeylerde olması gerektiğini göstermektedir.

4.2.1.5. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I) sol-jeli kullanılarak β-kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Tez kapsamında sentezlenen ve tüm sol-jellerde ortak olan tetraetilortosilikat, etanol ve su gibi bileşiklerin yanı sıra porojen madde olarak poli(etilenglikol) (PEG mw ~600) sentez ortamına eklenmesiyle üretilen bir diğer malzeme de C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS sol-jelidir. Bu malzeme ile yapılan zenginleştirme çalışmaları sonucunda elde edilen ESI kütle spektrumu Şekil 4.23’de verilmektedir. Kütle spektrumu verilerinin mMass açık kaynak kodlu yazılıma aktarılması sonucu gerçekleştirilen karşılaştırma çalışmalarında C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS sol-jeli için fosfopeptit eşleşme oranı %11 (Ek-1, Şekil 12.) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Eşleşen fosfopeptitlerin listesi Tablo 4.6.’da verilmektedir. Karakterizasyon basamaklarından ATR-FTIR spektrumunda, ortamda bulunan PEG (mw ~600)’in kondezasyon basamağını yavaşlatarak magnezyum sitrattan (C₆H₆MgO₇) gelen sitrat moleküllerinin yapıya katılımını azalttığı sonucuna varılmıştır. Yapıya gözeneklilik katarak yüzeyi arttırmasını sağlamak amacıyla eklenen PEG’in, mMass yazılımı kullanılarak elde

edilen verilere bakıldığında istenen etkiyi göstermediği görülmüş olup, “Uniprot” verileri ile yapılan matematiksel eşleştirmeler sonucunda, sentezlenen tüm sol-jeller içerisinde en düşük oranlı zenginleşme kapasitesinin $C_6H_6MgO_7-HNO_3-PEG@TEOS$ sol-jelinde gözlenmesi de bu sonucu doğrulamaktadır.

Tablo 4.6. $C_6H_6MgO_7-HNO_3-PEG@TEOS$ (3I kodlu sol-jel) İçin β –Kazein Eşleşme Listesi.

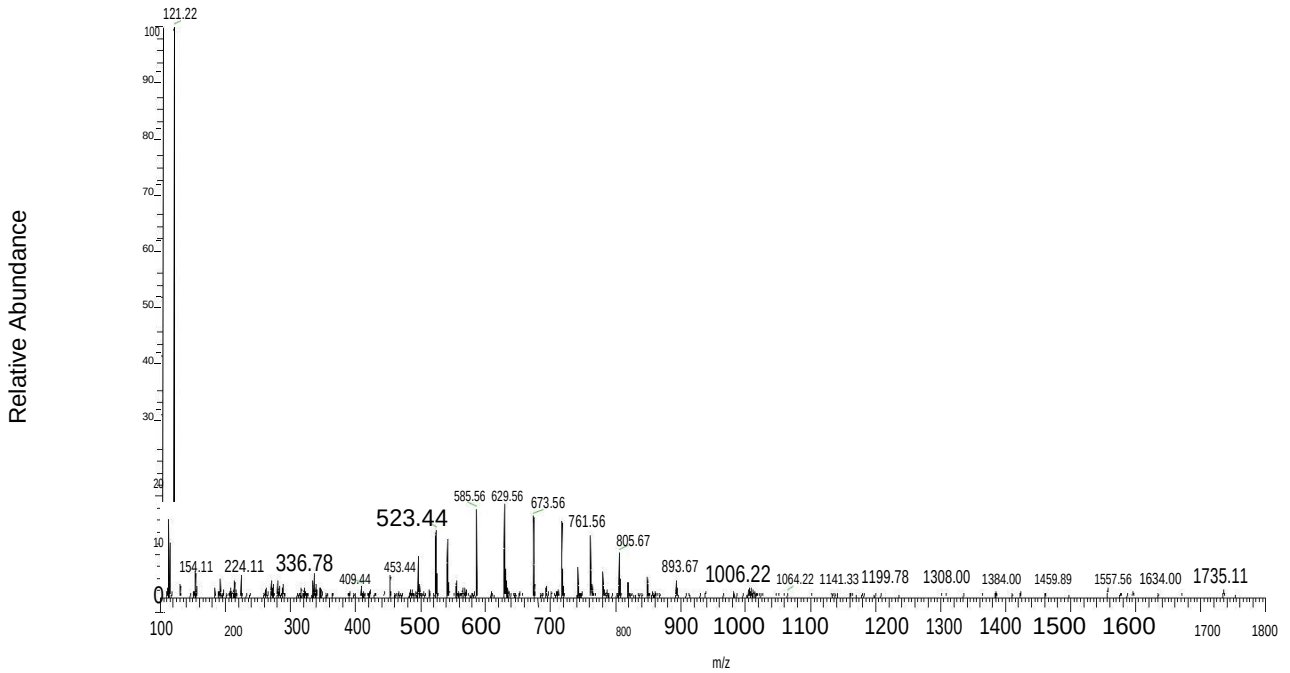
Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
455,5063	10	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
627,444	7	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
312,6989	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [2xP*]
313,5163	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
325,0486	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [3xP*]
387,7086	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
344,4775	6	k.FQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
564,5784	10	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSK.v [4xP*]
609,4271	9	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSK.v [2xP*]
675,4838	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSK.v [1xP*]
587,2948	10	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSKVK.e [4xP*]
643,5527	9	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSKVK.e [3xP*]
805,7269	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [12xP*]
806,2888	9	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [2xP*]
850,7145	9	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
652,8254	10	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [2xP*]
805,7842	8	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [1xP]
632,3127	5	k.AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [2xP*]
284,1481	8	r.DMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [1xP*]

*P=Fosfopeptit.

4.2.1.6. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J) sol-jeli kullanılarak β -kazein fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

PEG maddesi katkılanarak üretilen C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS sol-jelinde ise asit katalizörü olarak H₃PO₄ (fosforik asit) bileşiğinde faydalanılmıştır. Farklı asit bileşiklerinin sol-jel yapılarında önemli değişimlere sebep oldukları bilinmektedir. Bu sol-jel tipiyle yürütülen zenginleştirme çalışmaları neticesinde Şekil 4.24'deki ESI kütle spektrumu elde edilmiştir.

3J_Betacasein #22 RT: 0.60 AV: 1 NL: 5.58E6
T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



Şekil 4.24. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β -kazein peptit çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS sol-jeli kullanılarak gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarının performansını değerlendirmek amacıyla ESI-MS spktrumları mMass yazılımına aktarılmış ve veriler β -kazein'e ait peptitlerin teorik m/z değerleriyle karşılaştırılmıştır (Ek-1, Şekil 14). Eşleşen fosfopeptitlerin listesi Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu Sol-Jel) İçin β –Kazein Eşleşme Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
742,2966	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
271,1231	9	k.IEKFAQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
207,0894	10	k.FQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
818,6358	9	k.FQSEEQQTDELQDKIHFPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
675,4838	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
587,2948	10	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [4xP*]
743,8624	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [5xP*]
805,7269	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [12xP*]
850,7145	9	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
805,7842	8	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [1xP*]
818,7437	9	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQK.a [3xP*]
102,0529	9	k.AVPYPQR.d [1xP*]

*P=Fosfopeptit.

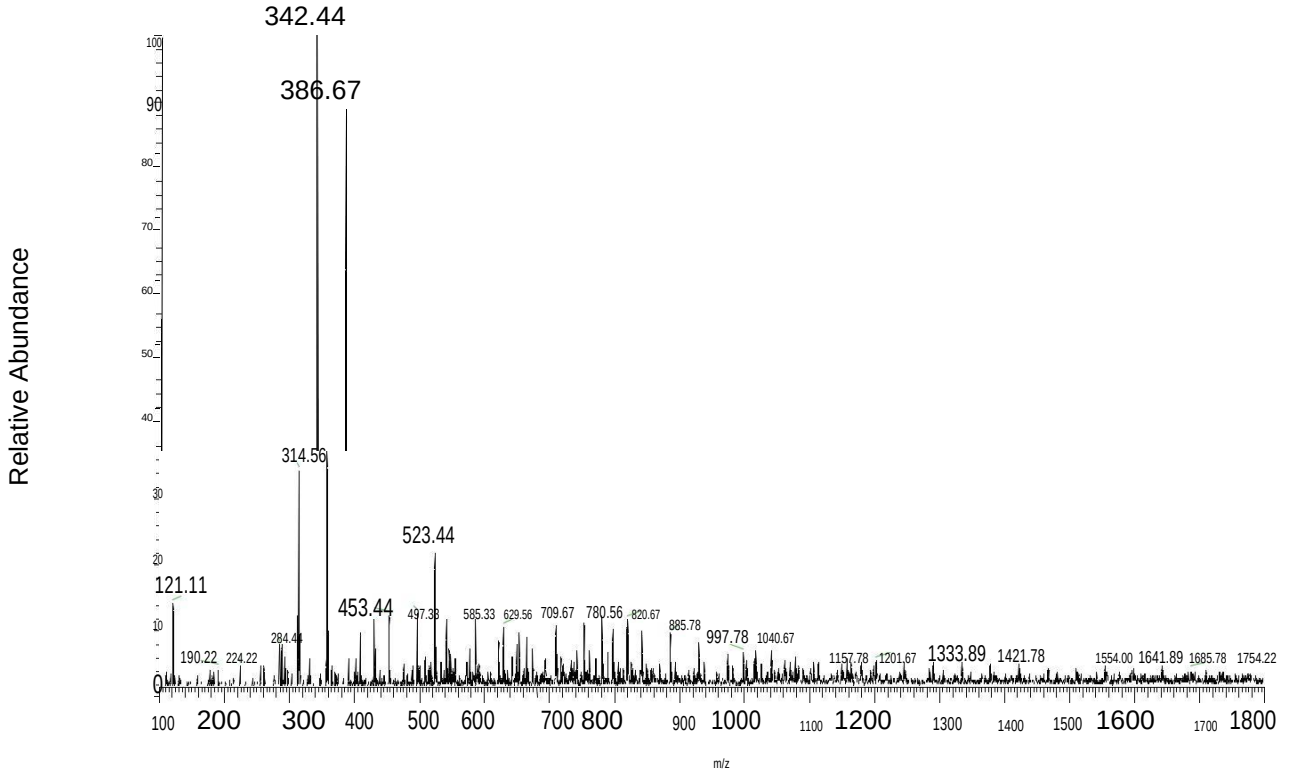
4.2.2. Sol-Jel Malzemelerle β - Kazein ve BSA Peptit Karışımlarının Zenginleştirilmesi

Tez kapsamında sentezlenen sol-jel tiplerinin fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarındaki etkinliklerini daha iyi test etmek amacıyla, fosfopeptitlerin bulunduğu ortamı diğer peptitler bakımında biraz daha karmaşık hale getirmek gerekmektedir. Literatürdeki benzer çalışmalarda da bu işlemi gerçekleştirmek amacıyla BSA gibi büyük proteinlerin tripsin enzimiyle parçalanması sonucu elde edilen peptitlerden çok sıklıkla faydalanılmaktadır. Tez çalışmalarında da β -kazein protein tripsin ile parçalandıktan sonra fosfopeptitleri de içeren β -kazein peptit karışımı, BSA peptitleriyle karıştırılmış ve elde edilen son peptit karışımı sol-jellerle muamele edilmiştir. Bu sayede doğal koşullara yakın biyolojik ortamda, sol-jellerin etkinlikleri test edilmiş ve performansları izlenmiştir.

4.2.2.1. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS sol-jeli kullanılarak β -kazein ve BSA karışımındaki fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS sol-jeliyle β -kazein/BSA karışımı içerisinde gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme işleminde sonra, elde edilen çözelti ESI kütle spektrometresi ile analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.25’te verilmiştir.

3B_betacasein_bsa #23 RT: 0.63 AV: 1 NL: 3.20E6
T: +p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



Şekil 4.25. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β -kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Bu kütle spektrumunda bulunan sinyaller mMass yazılımına aktarılıp işlendikten sonra, elde edilen m/z değerleri sadece β -kazein'e ait peptitler içerisinde yer alan fosfopeptitler dikkate alınarak karşılaştırılmıştır. Eşleşen fosfopeptitlerin listesi Tablo 4.8.'de verilmiştir. Bu işlemler sonucunda $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B) sol-jelin karmaşık ortamda zenginleşme yüzdesi % 27 olarak (Ek-1, Şekil 16.) belirlenmiştir. Sentezlenen diğer sol-jellerle birlikte değerlendirilerek karşılaştırma yapıldığına en yüksek fosfopeptit zenginleştirme performansının yine $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jeliyle gerçekleştirilebildiği görülmüştür. Bu sonuçlar, karakterizasyon sonuçları da dikkate alınarak değerlendirildiğinde, kendi yapısında da fosfat grupları içeren ve Mg iyonlarının varlığı en belirgin biçimde gözlenebilen $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jelinin bu çalışmalarda da neden yüksek performans gösterdiği anlaşılabilmektedir. Bununla birlikte özellikle TGA ölçümlerinde gözlenen $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jeline ait yüksek su tutma kapasitesinin, bu sol-jelin farklı ortamlardaki fosfopeptit zenginleştirme başarısının bir diğer nedeni olarak gösterebiliriz. Çünkü bu sayede tüm peptitlerin içerisinde bulunduğu

sulu koşullarda, çözeltiyi daha iyi absroplayarak fosfopeptitlerin jel içerisindeki fonksiyonel bölgelere ulaşmasını kolaylaştırmıştır.

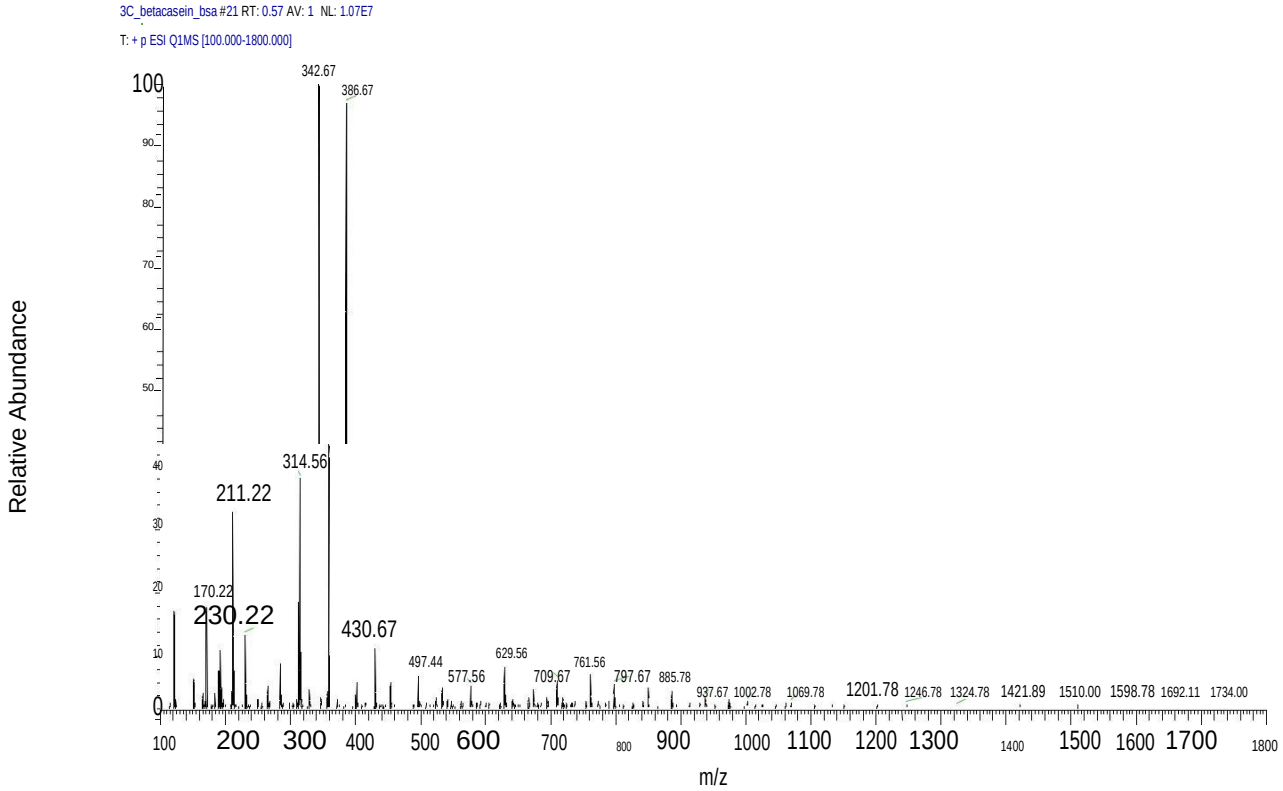
Tablo 4.8. ̢–Kazein/BSA karışımının C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
431,5164	10	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
497,121	9	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [5xP*]
312,6989	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [2xP*]
313,5163	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
742,2966	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
782,2798	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
1042,704	3	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
387,7086	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
554,4038	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
359,7229	7	k.IEKFAQSEEQQTEDELQDK.i [2xP*]
344,4775	6	k.FQSEEQQTEDELQDK.i [1xP*]
818,6358	9	k.FQSEEQQTEDELQDKIHQFAQTQSLVYPFGPIPNLPPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
1160,136	5	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLPPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [6xP*]
753,8582	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLPPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [6xP*]
1141,596	5	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLPPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [2xP*]
781,737	10	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
789,7337	10	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [10xP*]
797,4036	9	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [1xP*]
797,7303	10	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [11xP*]
841,8293	9	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [6xP*]
885,7505	8	k.YPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
1180,665	6	k.YPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
1052,383	7	k.YPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQK.a [3xP*]
770,1475	4	k.AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [1xP*]

*P=Fosfopeptit.

4.2.2.2. C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS sol-jeli kullanılarak β-kazein ve BSA karışımındaki fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Çalışmanın bir diğer aşamasında, β-Kazein/BSA karışımındaki fosfopeptitleri zenginleştirmek amacıyla C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS sol-jeli kullanılmıştır. Zenginleştirme işlemleri sonrası elde edilen ESI kütle spektrumu ise Şekil 4.26’da verilmektedir.



Şekil 4.26. C₆H₆MgO₇-HNO₃ @TEOS (3C kodlu Sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Kütle spektrumunda yer alan m/z değerleri mMass yazılımına aktarılmış ve buradan elde edilen sinyal verileriyle β-Kazein’in tripsin ile teorik olarak parçalanması sonucu elde edilen değerler karşılaştırılmıştır. Eşleşen fosfopeptitlerin listesi Tablo 4.9’da verilmiştir. C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS sol-jeli için fosfopeptit zenginleştirme ve eşleşme oranı mMass yazılımı ile % 21 (Ek-1, Şekil 18.) olarak hesaplanmıştır.

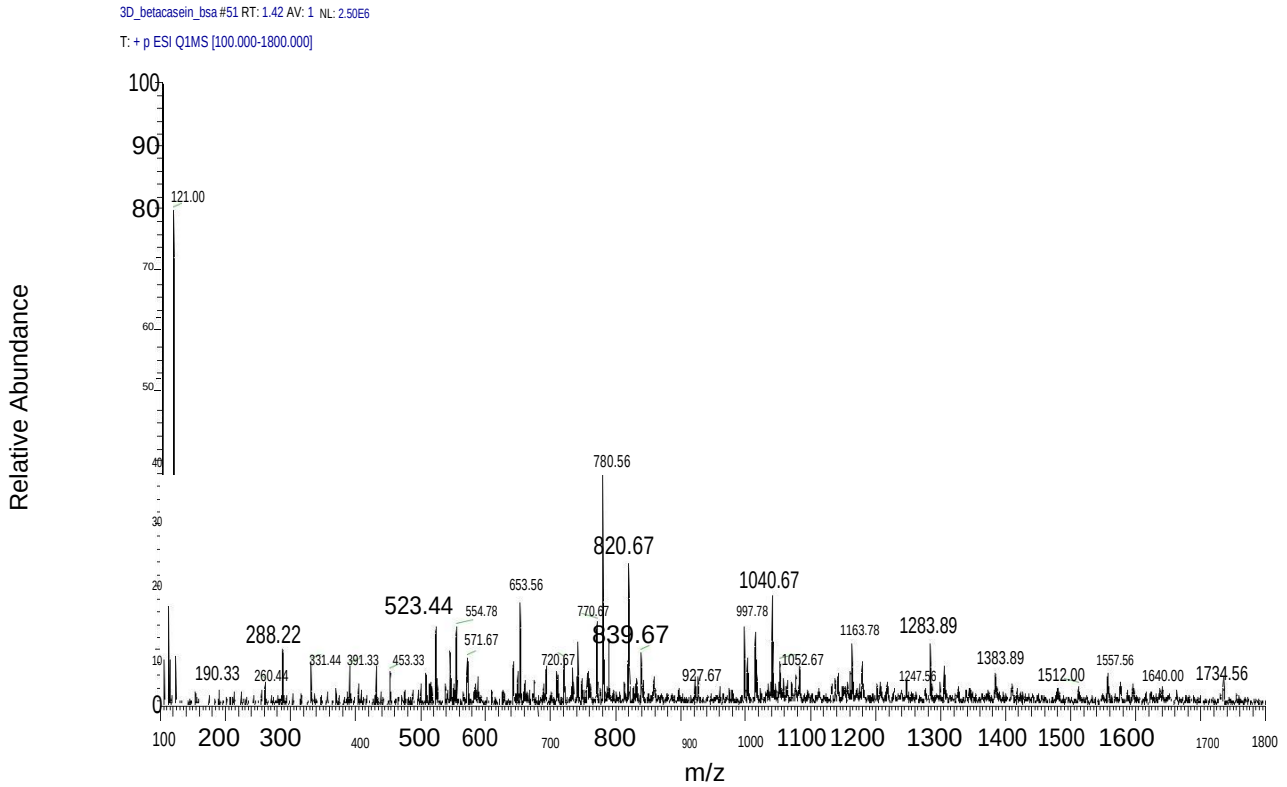
Tablo 4.9. β -Kazein/BSA karışımının $C_6H_6MgO_7-HNO_3@TEOS$ (3C kodlu Sol-Jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
431,5164	10	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
312,6989	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [2xP*]
313,5163	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
348,2395	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
401,7536	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [2xP*]
309,0553	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [1xP*]
387,7086	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
416,0547	8	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
498,1947	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
541,0761	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [3xP*]
554,4038	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
348,2991	7	k.IEKFAQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
359,7229	7	k.IEKFAQSEEQQTDELQDK.i [2xP*]
784,6994	3	k.IEKFAQSEEQQTDELQDK.i
344,4775	6	k.FQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
564,5784	10	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
913,6371	6	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [2xP*]
773,7404	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [8xP*]
789,7337	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [10xP*]
797,7303	10	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [11xP*]
841,8293	9	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [6xP*]
850,7145	9	k.EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
732,7917	10	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [12xP*]
825,7757	8	k.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [3xP*]
102,0529	9	k.AVPYPQR.d [1xP*]
316,66	10	k.AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [2xP*]
342,8474	9	k.AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [1xP*]
284,1481	8	r.DMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [1xP*]

*P= Fosfopeptit.

4.2.2.3. C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS sol-jeli kullanılarak β -kazein ve BSA karışımındaki fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Diğer sol-jeller ile aynı şekilde sentezlenen yalnızca sentez aşamasında diğer sol-jellerden farklı olarak HCl eklenen C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS malzemesinin daha karmaşık koşullardaki zenginleştirme performansını tespit etmek amacıyla, β -kazein/BSA triptik peptit karışımından zenginleştirme çalışması yapılmış ve elde edilen çözelti ESI kütle spektrometresi ile analiz edilerek Şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.27. C₆H₆MgO₇-HCl@TEOS (3D kodlu sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β -kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

ESI kütle spektrumundan elde edilen m/z değerleri matematiksel yorumlama amacıyla mMass yazılımına aktarılmıştır. Farklı asitler eklenerek sentezlenen soljellerden HCl eklenen malzeme için yazılımsal gerçek/teorik fosfopeptit karşılaştırma oranı % 28 (Ek-1, Şekil 20) olarak bulunmuştur. Eşleşen fosfopeptit listesi Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.10. β -Kazein/BSA karışımının $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ (3D kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
439,513	10	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
488,2359	9	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
497,121	9	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [5xP*]
627,444	7	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
758,5056	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
1057,288	4	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [2xP*]
1077,28	4	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
1137,255	4	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
289,5264	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
508,5279	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [5xP*]
546,0589	5	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [1xP*]
782,2798	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
1042,704	3	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
387,7086	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
452,4996	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [2xP*]
475,3472	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
541,0761	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [3xP*]
554,4038	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
1161,111	3	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
1071,401	2	k.FQSEEQQTDELQDK.i [2xP*]
760,8628	10	k.FQSEEQQTDELQDKIHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLT QTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
818,6358	9	k.FQSEEQQTDELQDKIHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLT QTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
827,5209	9	k.FQSEEQQTDELQDKIHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLT QTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [2xP*]
1132,21	7	k.FQSEEQQTDELQDKIHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLT QTPVVVPFLQPEVMGVSK.v [8xP*]
572,5751	10	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSK.v [5xP*]
588,5683	10	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSK.v [7xP*]
609,4271	9	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSK.v [2xP*]
675,4838	8	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSK.v [1xP*]
1160,136	5	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSK.v [6xP*]
661,323	9	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPFLQPEVMG VSKVK.e [5xP*]

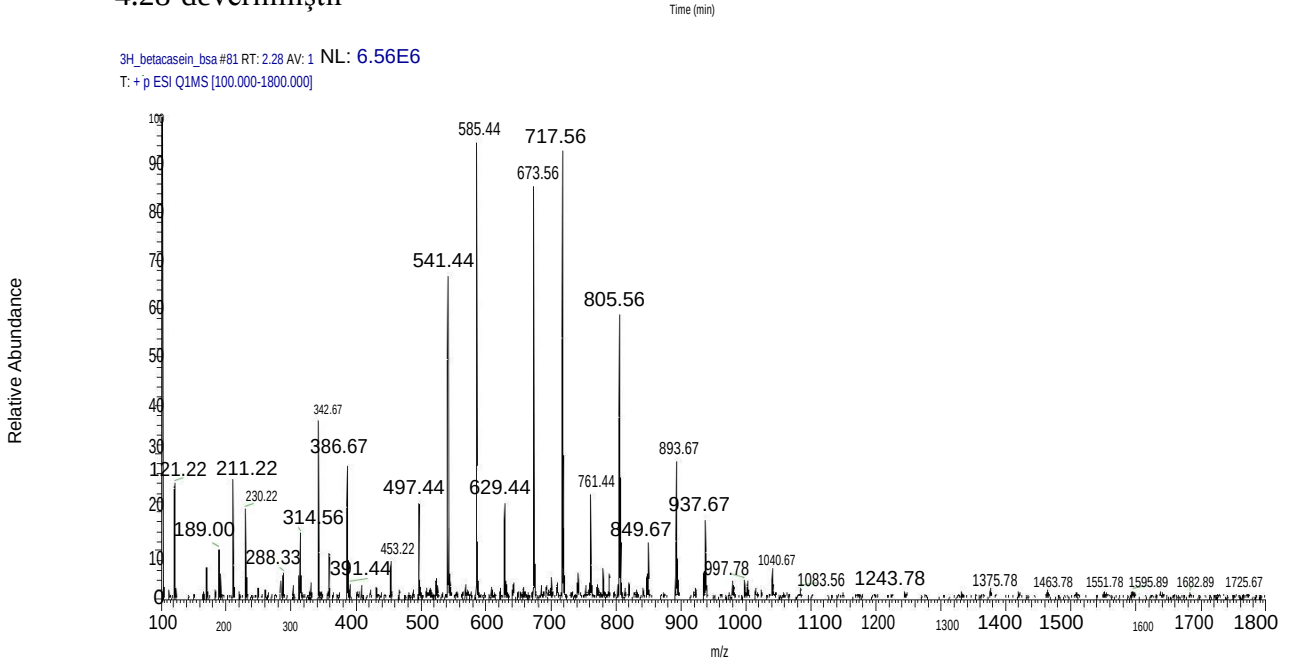
733,8666	8	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNPPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSKVK.e [4xP*]
743,8624	8	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNPPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSKVK.e [5xP*]
1141,596	5	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNPPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSKVK.e [2xP*]
733,7572	10	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [3xP*]
741,7539	10	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [4xP*]
789,7337	10	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [10xP*]
859,5996	9	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [8xP*]
1070,641	7	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [5xP*]
1082,064	7	k.EMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [6xP*]
692,8086	10	k.YPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
708,8018	10	k.YPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
734,1348	9	k.YPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [3xP*]
760,7902	9	k.YPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [6xP*]

*P=Fosfopeptit.

4.2.2.4. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jeli kullanılarak β-kazein ve BSA karışımındaki fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

β-kazein ve BSA karışımındaki fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi işlemleri PEG içeren sol-jellerle de gerçekleştirilmiştir. PEG içeren sol-jellerin sadece β-kazein peptitleri ile yürütülen zenginleştirme çalışmalarında yüksek performans göstermemelerine ve sorunlarla karşılaşılmasına rağmen BSA varlığındaki etkinlikleride incelenmiştir. Sol-jel malzeme yüzeyinde daha fazla alan oluşturmaya beklentisi ile PEG eklenerek sentezlenen sol-jellerden bir tanesi C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS dir. Bu sol-jelin β-kazein/BSA peptitleri karışımından fosfopeptitleri zenginleştirilmesi sonucu elde edilen ESI kütle spektrumu Şekil

4.28'de verilmiştir



Şekil 4.28. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Bu spektrumların mMass yazılımına aktarılması sonucunda fosfopeptit yakalama oranı C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jel malzemesi için % 25 (Ek-1, Şekil 22) olarak belirlenmiştir. Eşleşen fosfopetidler Tablo 4.11.'de verilmektedir. PEG içeren sol-jellerin zenginleştirme çalışmalarında kullanılması sonucunda ortaya çıkan, PEG sinyallerinin diğer peptit sinyallerini baskılaması sorunu bu çalışmalarda daha az gözlenmiştir. Bunu sonucu olarak C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS sol-jeli için fosfopeptit zenginleştirme oranında artış gözlenmiştir (%20 → 25).

Tablo 4.11. β-Kazein/BSA karışımının C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
431,5164	10	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
455,5063	10	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
313,5163	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
455,217	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [1xP*]
343,2829	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [1xP*]
387,7086	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]

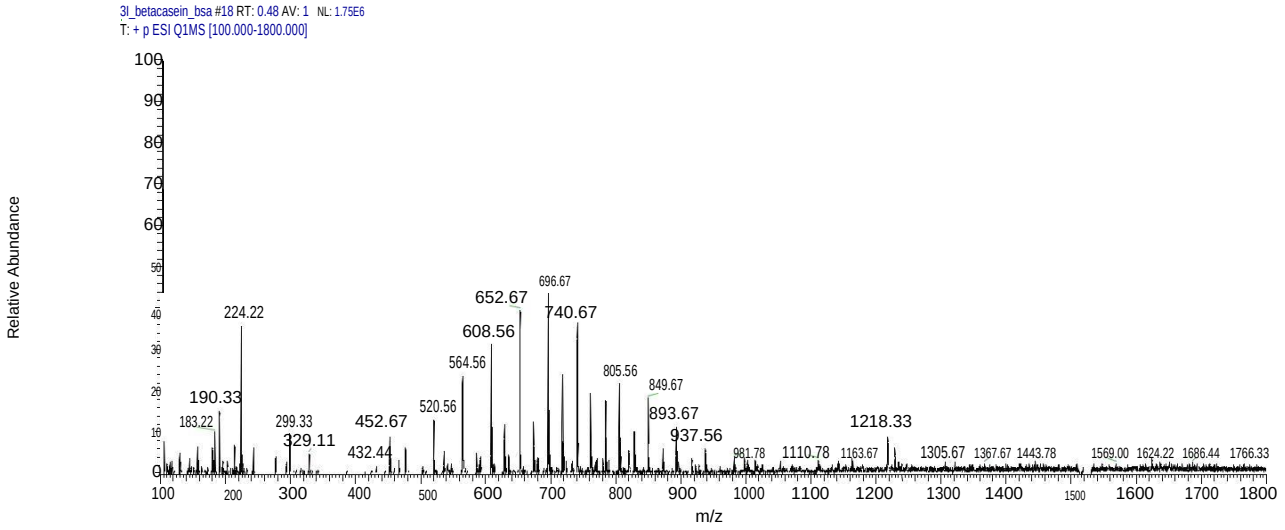
554,4038	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
359,7229	7	k.IEKFAQSEEQQTEDELQDK.i [2xP*]
685,4796	8	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSK.v [2xP*]
587,2948	10	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSKVK.e [4xP*]
652,4378	9	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSKVK.e [4xP*]
753,8582	8	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSKVK.e [6xP*]
938,1699	6	k.IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSKVK.e [1xP*]
789,7337	10	k.EMPFPKYPVEPFTEQSLSLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [10xP*]
797,7303	10	k.EMPFPKYPVEPFTEQSLSLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [11xP*]
805,7269	10	k.EMPFPKYPVEPFTEQSLSLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [12xP*]
850,7145	9	k.EMPFPKYPVEPFTEQSLSLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPL PPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
652,8254	10	k.YPVEPFTEQSLSLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [2xP*]
805,7842	8	k.YPVEPFTEQSLSLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [1xP*]
885,7505	8	k.YPVEPFTEQSLSLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [9xP*]
895,7463	8	k.YPVEPFTEQSLSLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMF PPQSVLSLSQSK.v [10xP*]
284,1481	8	r.DMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [1xP*]

*P=Fosfopeptit.

4.2.2.5. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS sol-jeli kullanılarak β-kazein ve BSA karışımındaki fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Biyolojik olarak uyumluluğu, yüksek orandaki hidrofilik yapısı, suda çözünürlüğü ve toksisite içermemesi sebebi ile biyolojik sistemler için malzeme sentezlerinde tercih edilen PEG (MW~600) molekülleri, C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I) sol-jelinin yapısında da bulunmaktadır. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS ile yapılan zenginleştirme sonrası elde edilen ESI kütle spektrumu Şekil 4.29’da verilmiştir. Fosfopetit zenginleşme oranlarının belirlenmesi amacıyla mMass yazılımı kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda %13 (Ek-1, Şekil 24) gibi oldukça düşük bir oran bulunmuştur. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS

sol-jeli için deneysel olarak elde edilen peptit sinyalleriyle teorik olarak elde edilen peptit sinyallerinin eşleşme listesi Tablo 4.12’deki gibidir.



Şekil 4.29. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Tablo 4.12. β-Kazein/BSA karışımının C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.

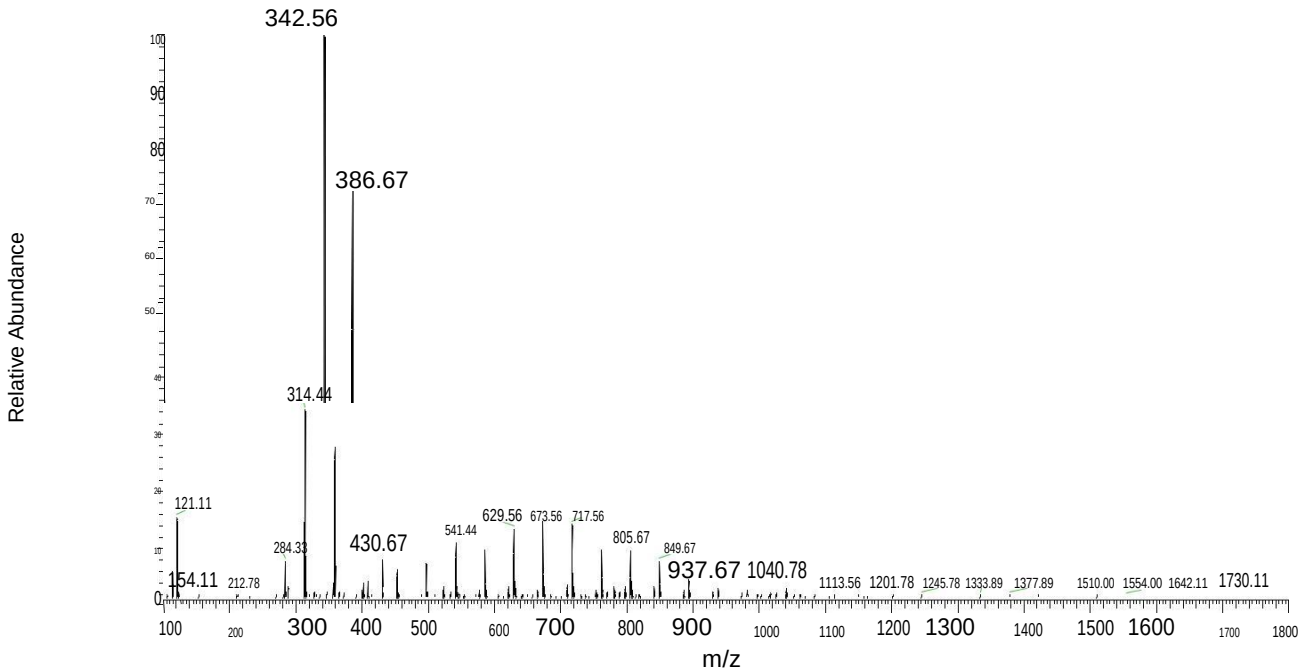
Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
762,2882	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [5xP*]
452,4996	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [2xP*]
564,5784	10	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
609,4271	9	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [2xP*]
741,7539	10	k.EMPFPKYPVEPFTEQSLSLTLDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [4xP*]
805,7269	10	k.EMPFPKYPVEPFTEQSLSLTLDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [12xP*]
806,2888	9	k.EMPFPKYPVEPFTEQSLSLTLDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [2xP*]
850,7145	9	k.EMPFPKYPVEPFTEQSLSLTLDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [7xP*]
652,8254	10	k.YPVEPFTEQSLSLTLDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.v [2xP*]
102,0529	9	k.AVPYPQR.d [1xP*]

P*=Fosfopeptit.

4.2.2.6. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS sol-jeli kullanılarak β-kazein ve BSA karışımındaki fosfopeptitlerinin zenginleştirilmesi

Biyolojik bir ortamda kullanılacak sol-jel gibi bir malzemeye PEG (mw~600) ilave edilmesi ağ yapısına gözeneklilik katmasının yanı sıra sol-jel partiküllerinin kolloidal kararlılığını da artırabilmektedir. Tez çalışmalarının bu bölümünde, PEG içermeyen formu en yüksek fosfopeptit zenginleştirme performansı sergileyen C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS sol-jelide β-kazein/BSA peptit karışımındaki fosfopeptitleri zenginleştirmek amacıyla kullanılmış ve elden edilen ESI kütle spektrumu Şekil 4.30'da verilmiştir.

3J_betacasein_bsa #23 RT: 0.63 AV: 1 NL: 1.60E7
T: +p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



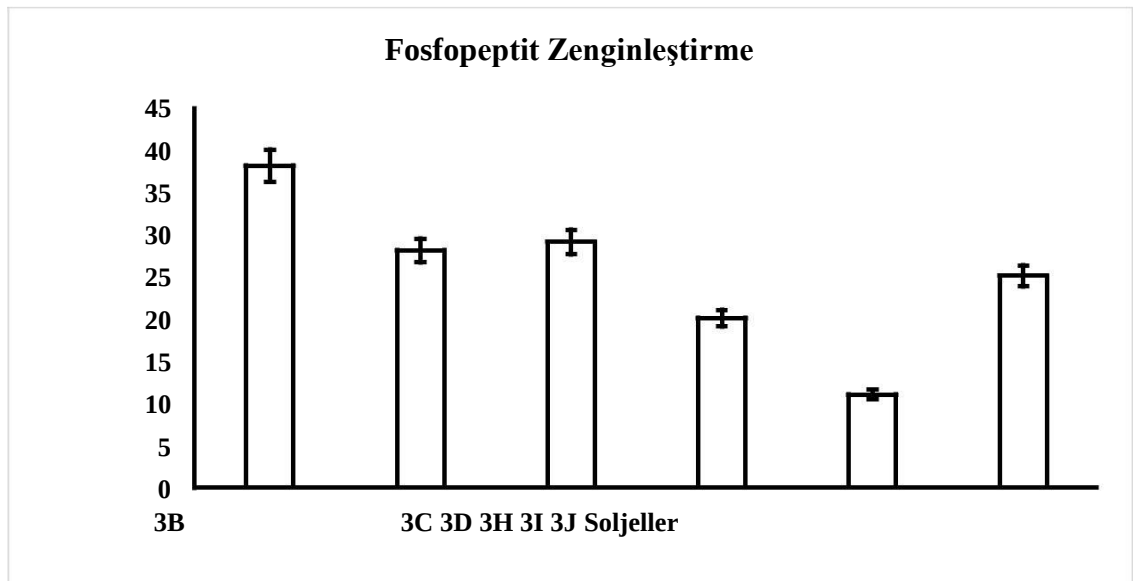
Şekil 4.30. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-kazein/BSA peptit karışım çözeltisinin ESI Kütle Spektrumu.

Bu spektrumdan alınan m/z değerleri mMass yazılımına aktarılmıştır. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) için β-Kazein ve BSA peptit karışımından elde edilen fosfopeptit zenginleştirme yüzdesi % 17 (Ek-1, Şekil 25) olarak hesaplanmıştır. Eşleşen fosfopeptit listesi Tablo 4.13.'te verilmektedir.

Tablo 4.13. β -Kazein/BSA karışımının $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4-PEG@TEOS$ (3J kodlu Sol-Jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
431,5164	10	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
455,5063	10	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
312,6989	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [2xP*]
313,5163	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
391,6435	8	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [6xP*]
387,7086	9	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [6xP*]
554,4038	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
271,1231	9	k.IEKFAQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
229,9874	9	k.FQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
344,4775	6	k.FQSEEQQTDELQDK.i [1xP*]
818,6358	9	k.FQSEEQQTDELQDKIHPPAQTSLSVYPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
588,5683	10	k.IHPFAQTSLSVYPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [7xP*]
675,4838	8	k.IHPFAQTSLSVYPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
753,8582	8	k.IHPFAQTSLSVYPFGPIPNLQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK.e [6xP*]
632,3127	5	k.AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [2xP*]
770,1475	4	k.AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [1xP*]
284,1481	8	r.DMPIQAFLLYQEPVLGPVR.g [1xP*]

P*=Fosfopeptit.



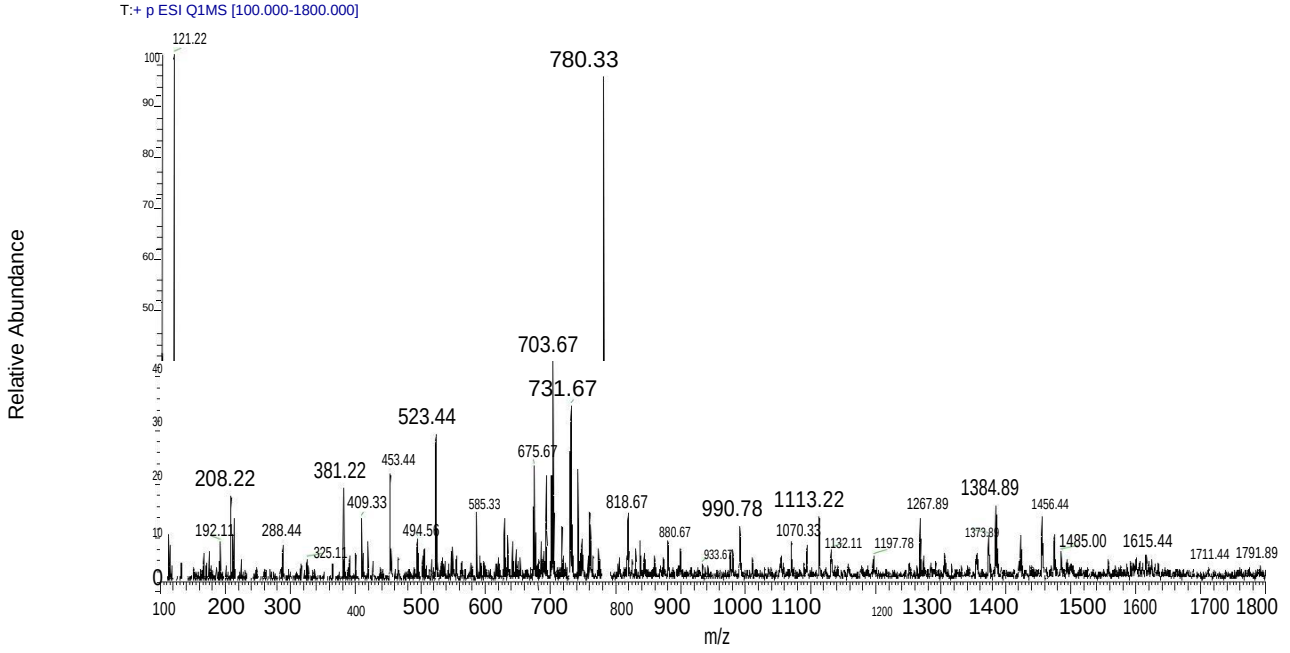
Şekil 4.31. Sol-jellerin Fosfopeptit Zenginleştirme Oranları

Tüm sentezlenen sol-jeller ile yapılan çalışmalar ve ESI-MS kütle parametrelerinin mMass yazılımı ile incelenmesi sonucu fosfopeptit zenginleştirmede en başarılı soljelin karmaşık ortamda bile yüksek fosfopeptit yakalama kapasitesine sahip 3B kodlu $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ sol-jel olduğu görülmüştür (Şekil 4.31) $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ kullanılarak yapılan fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarında tayin edilebilecek en küçük derişimin β -kazein'e göre değerlendirme yapıldığında yaklaşık 13 pmol/mL (13 fmol/ μ L) olduğu görülmüştür. Bir sonraki hedef olan gerçek bir örnekle çalışmak için “yağsız süt” doğal bir numune olarak tercih edilmiştir.

.

4.2.3. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ Sol-Jel ile Süt Proteinlerinin Zenginleştirilmesi

Farklı alt birimlerden oluşan ve bir fosfoprotein olan kazein, sütte bulunan proteinlerin yaklaşık % 80'nini oluşturmaktadır [64]. Bu nedenle süt tez kapsamında fosfopeptit zenginleştirmede kullanılabilecek doğal biyolojik örnek olarak tercih edilmiştir. Sütte bulunan yağların spektrometrik ölçümlerde sorun çıkarması nedeniyle çalışmalarda yağsız süt kullanılmıştır. Süt ile gerçekleştirilen zenginleştirme deneylerinde β -kazein ve β -kazein/BSA peptit karışımlarında en yüksek fosfopeptit yakalama oranına sahip olan $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) malzeme kullanılmıştır. Deneysel kısımda ifade edildiği gibi hazırlanan süt çözeltisi $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ ile muamele edilmiş, elde edilen zenginleştirme çözeltisi ESI kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen spektrum Şekil 4.32'de verilmektedir.



Şekil 4.32. Süt poteinlerine ait peptit karışımının $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmesi sonucu elde edilen ESI kütle spektrumu.

mMass yazılımında işlenen ESI kütle spektrumundaki m/z değerleri için S/N oranı 10 olarak seçilmiş ve protein veri tabanından (www.uniprot.org) sadece β -kazein için alınan fosfopeptit değerleri için gerçek süt numunesi ile yapılan eşleştirme sonuçları Ek-1, Şekil 26'da verilmiştir. Kütle tolerans aralığı 0,2 Da, en büyük yük (maximum charge) 10, sinyal gürültü oranı 10 olarak belirlenen ve parçalama enzimi olarak tripsin seçilen mMass yazılımı ile yapılan eşleşme sonucunda doğal örnek olan yağsız inek sütü için fosfopeptit eşleşme oranı sadece β -kazein için % 17 olarak hesaplanmıştır (Ek-1, Şekil 27). Tablo 4.14'te de eşleşen fosfopeptit listeleri verilmiştir. Süt gibi çok sayıda protein içeren bir doğal numune için, tripsin ile parçalama sonrası elde edilen peptitlerin miktarı düşünüldüğünde, elde edilen oranın oldukça iyi bir değer olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 4.14. Süt'ün $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) ile zenginleştirilmesi sonrası eşleşen peptitlerin Listesi.

Eşleşen Kütle (m/z)	Yük (n) [M+nH ⁿ⁺]	Eşleşen Fosfopeptit Dizilimi (sequence)
497,121	9	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [5xP*]
718,5224	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [3xP*]
731,8501	6	k.VLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]

455,217	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [1xP*]
495,2002	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
742,2966	4	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITR.i [4xP*]
325,0486	10	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [3xP*]
452,4996	7	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [2xP*]
554,4038	6	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [4xP*]
1054,49	3	r.ELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK.k [2xP*]
419,5088	6	k.IEKFAQSEEQQTEDELQDK.i [2xP*]
1071,401	2	k.FQSEEQQTEDELQDK.i [2xP*]
760,8628	10	k.FQSEEQQTEDELQDKIHFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [4xP*]
818,6358	9	k.FQSEEQQTEDELQDKIHFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [1xP*]
880,8318	9	k.FQSEEQQTEDELQDKIHFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [8xP*]
980,8141	8	k.FQSEEQQTEDELQDKIHFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [7xP*]
990,8099	8	k.FQSEEQQTEDELQDKIHFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [8xP*]
1132,21	7	k.FQSEEQQTEDELQDKIHFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLT QTPVVVPPFLQPEVMGVSK.v [8xP*]
685,4796	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSK.v [2xP*]
705,4712	8	k.IHPFAQTQSLVYPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMG VSK.v [4xP*]

5. SONUÇLAR

- Tez kapsamında sol-jel metoduyla $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B), $C_6H_6MgO_7-HNO_3@TEOS$ (3C), $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ (3D), $C_6H_6MgO_7-HCl-PEG@TEOS$ (3H), $C_6H_6MgO_7-HNO_3-PEG@TEOS$ (3I), $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4-PEG@TEOS$ (3J) türlerinde malzemeler camsı jel yapısında ve kararlı bir şekilde başarıyla sentezlenmiştir.
- Tüm sol-jel malzemeler yapısal olarak ATR-FTIR spektroskopisi ve Termo Gravimetrik Analiz (TGA) teknikleriyle incelenmiş, Si-O-Si ağ yapısına sahip oldukları ve sitrat anyonlarıyla birlikte Mg katyonlarını da içerdikleri anlaşılmaktadır.
- Sentezlenen sol jel malzemelerin yüzey analizleri X-ışını fotoelektron spektroskopisi ile yapılarak çekirdek seviyeleri incelenmiş ve yayılan çekirdek fotoelektronlarının da analizi ile fosfopeptit zenginleştirmede etkin bir rol oynayan $C_6H_6MgO_7$ 'ın malzemenin yapısına yüzde 0,22 oranında girdiği gözlemlenmiştir. Yapıda Auger elektronlarından kaynaklı pikler görülse de bu pikler sonuçları yorumlama da problem oluşturmaz.
- Kullanılan farklı tipteki asit katalizörlerinin etkilerine bağlı olarak, sol-jel başlangıç çözeltisinde bulunan bileşenlerin ağ yapısına katılımı farklı oranlarda gerçekleşmiştir. Yapısal katılımı tam olarak tamamlanamayan bileşenler yıkama işlemleri esnasında sol-jel yapısından uzaklaşmış ve özellikle ATR-FTIR spektrumlarında da gözlenen fonksiyonel grup değişimlerine neden olmuştur. Bu durum üretilen sol-jellerin fosfopeptit zenginleştirme performanslarını etkileyen en önemli nedenler arasındadır.
- $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B) ve $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ (3D) sol-jellerinin TGA çalışmalarında diğer sol-jellere kıyasla daha hızlı ve yüksek oranda su çıkışı gözlenmiş. Diğer sol-jel malzemelerle aynı koşullarda vakum etüvünde kurutulmasına rağmen, onlara kıyasla daha hidrofilik karakterde oldukları anlaşılmıştır. Bununla birlikte bu malzemelerin gözenekliliklerinin ve yapısal özelliklerinin suyu hızlı bir şekilde iletmeye uygun oldukları anlaşılmaktadır.
- Asit olarak H_3PO_4 eklenmiş olan $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B) tayin sınırı altında olan fosfopeptitlerin düşük derişimlerini tayin etmeyi mümkün kılmıştır. Bu sol-jel türü kullanılarak yaklaşık 13 fmol/ μ L derişime sahip fosfopeptitler başarıyla zenginleştirilerek ESI-MS ile gözlenmiştir.

- $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B) gibi yapısında su tutma özelliğine sahip sol-jel malzemelerin fosfopeptit zenginleştirmede daha iyi sonuç vermelerinin nedeni suyun hızlı bir şekilde yapıya girebilmesine olanak sağlayan fiziksel özellik taşımaları ve bu sayede çözeltideki fosfopeptit difüzyonunu da hızlandırarak adsorpsiyon kapasitesini artırmalarından kaynaklanmaktadır.
- Gözenekliliği artırma beklentisi ile PEG eklenerek sentezlenen $C_6H_6MgO_7-HCl-PEG@TEOS$ (3H), $C_6H_6MgO_7-HNO_3-PEG@TEOS$ (3I), $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4-PEG@TEOS$ (3J) tipinde sol-jel malzemeler ESI kütle spektrometrisinde oldukça baskın PEG sinyalleri oluşmasına neden olmuştur. PEG türü polimer yapılar kütle spektrometrik analizlerde çok kolay iyonlaşan ve kuvvetli sinyaller veren maddeler arasındadır. Çok düşük derişimlerdeki fosfopeptitlerle yapılan kütle spektrometrik ölçümlerde, sol-jellerin yoğun bir şekilde yıkanmış olmalarına rağmen PEG sinyallerinin sıfırlanması mümkün olamamıştır. Bu nedenle yüksek fosfopeptit bağlama özelliklerine sahip olsalar dahi bu tip sol-jellilerin ESI-MS analizleri için uygun olmadıkları anlaşılmaktadır.
- $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B) sol-jeli doğal ve oldukça karmaşık bir örnek olan yağsız süt içerisindeki kazein ($\alpha S1$, $\alpha S2$, β ve κ -kazein) alt birimlerinde yer alan fosfopeptitlerin analizi içinde kullanılmıştır. Bunun için doğrudan tripsin ile parçalanan süt sol-jel malzemeyle muamale edilmiş, sol-jelin gerçek numunelerde kolaylıkla kullanılabileceği gösterilmiştir.
- Tez kapsamında ESI-MS sisteminden elde edilen veriler geçmişte farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen fosfopeptit zenginleştirme çalışmalarından farklı bir şekilde açık kaynak kodlu mMass yazılımı ile tarafısız bir şekilde değerlendirilmiş ve fosfopeptit zenginleştirme performansları bilimsel bir şekilde ortaya konulmuştur.
- Bu tez kapsamında sol-jellerin yapısına Magnezyum iyonları katkılayarak, fosfopeptit zenginleştirmede başarı sağlanabileceği gösterilmiş olup, sentez aşamasında fosforik asit kullanıldığında hem magnezyum katkılama kapasitesinin artırıldığı, hem de yapıya giren fosfat grupları nedeniyle fosfopeptit zenginleştirmede daha olumlu sonuçların elde edilebildiği gösterilmiştir. Gelecekte yürütülecek çalışmalarda sol-jel yapısında bulunan magnezyum miktarı daha da artırılarak daha iyi fosfopeptit zenginleştirme kapasitesinin elde edilmesi mümkün olabilecektir.

6. KAYNAKÇA

1. Pearson, H., *What is a gene?* Nature,. 441: p. 398. **2006.**
2. Rappsilber, J. and M. Mann, *What does it mean to identify a protein in proteomics?* Trends in Biochemical Sciences,. 27(2): p. 74-78. **2002.**
3. Verma, M., et al., *Proteomic approaches within the NCI Early Detection Research Network for the discovery and identification of cancer biomarkers*, in *Circulating Nucleic Acids in Plasma or Serum II*, Y.M.D. Lo, R.W.K. Chiu, and P.J. Johnson, Editors., New York Acad Sciences: New York. p. 103-115. **2001.**
4. Gross, J., *Mass Spectrometry A Textbook*, 20(1):p.434, **2004.**
5. Erhard, G., *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology V(4)*, New Jersey, :p103-115, **1981.**
6. Bianconi, E., et al., *An estimation of the number of cells in the human body*. Annals of Human Biology, 40(6): p. 463-471. **2013.**
7. Esser, D., et al., *Protein phosphorylation and its role in archaeal signal transduction*. FEMS Microbiol Rev, 40(5): p. 625-47. **2016.**
8. Hunter, T., *The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond*. Molecular Cell, 28(5): p. 730-738. **2007.**
9. Deribe, Y.L., T. Pawson, and I. Dikic, *Post-translational modifications in signal integration*. Nature Structural & Molecular Biology,. 17: p. 666. **2010.**
10. Adimoolam, S. and J.M. Ford, *p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair*. DNA Repair, 2(9): p. 947-954. **2003.**
11. Chabill, D., *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, New Jersey:p.30,**2007.**
12. Thingholm, T.E. and M.R. Larsen, *Phosphopeptide Enrichment by Immobilized Metal Affinity Chromatography*. Methods Mol Biol, 1355: p. 123-33. **2016.**
13. Sui, S., et al., *[Phosphopeptide enrichment strategy based on strong cation exchange chromatography]*. Se Pu, 26(2): p. 195-9. **2008.**
14. Fila, J. and D. Honys, *Enrichment techniques employed in phosphoproteomics*. Amino Acids, 43(3): p. 1025-1047. **2012.**
15. Niedermeyer, T.H.J. and M. Strohal, *mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra*. PLOS ONE, 7(9): p. e44913. **2012.**

16. Martin, S., et al., *mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis*. Rapid Communications in Mass Spectrometry,. 22(6): p. 905-908. **2008**.
17. Strohal, M., et al., *mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data*. Analytical Chemistry, 82(11): p. 4648-4651. **2010**.
18. Wiśniewski, M. and P. Gauden, *Pearson's Hard–Soft Acid–Base Principle as a Means of Interpreting the Reactivity of Carbon Materials*. Vol. 24. 389-402. **2006**.
19. Sun, Y.V. and Y.-J. Hu, *Chapter Three - Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases*, in *Advances in Genetics*, T. Friedmann, J.C. Dunlap, and S.F. Goodwin, Editors. Academic Press. p. 147-190. **2016**.
20. Chaston, J. and A.E. Douglas, *Making the Most of Omics for Symbiosis Research*. The Biological bulletin,. 223(1): p. 21-29. **2012**.
21. Randić, M. and A.T. Balaban, *On A Four-Dimensional Representation of DNA Primary Sequences*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 43(2): p. 532-539. **2003**.
22. Wilkins, M.R., et al., *Rapid Protein Identification Using N-Terminal “Sequence Tag” and Amino Acid Analysis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 221(3): p. 609-613. **1996**.
23. Pearson, H., *Genetics: What is a gene?* Nature, 441(7092): p. 398-401. **2006**.
24. Villard, J., *Transcription regulation and human diseases*. Swiss Med Wkly, 134(39-40): p. 571-9. **2004**.
25. Xiao, H., et al., *Systematic investigation of cellular response and pleiotropic effects in atorvastatin-treated liver cells by MS-based proteomics*. J Proteome Res, 14(3): p. 1600-11. **2015**.
26. Nicholson, J.K., J.C. Lindon, and E. Holmes, *'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data*. Xenobiotica, 29(11): p. 1181-1189. **1999**.
27. Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey, *Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry*. Annual Review of Biochemistry,. 70(1): p. 437-473. **2001**.

28. Anderson, N.L. and G. Anderson Norman, *Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words*. Electrophoresis, 19(11): p. 1853-1861. **2005**.
29. Liang, F., et al., *Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes*. Nat Genet, 25(2): p. 239-40. **2000**.
30. Resing, K.A. and N.G. Ahn, *Proteomics strategies for protein identification*. FEBS Letters, 579(4): p. 885-889. **2005**.
31. Farrokhi Yekta, R., M. Koushki, and N. Amiri DashAtan, *Advances in proteomics analytical techniques*. Journal of Paramedical Sciences; Vol 6, No 3 (2015): Summer, **2015**.
32. Giansanti, P., et al., *Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin*. Nat Protoc, 11(5): p. 993-1006. **2016**.
33. Mann, M., et al., *Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome*. Trends in Biotechnology, 20(6): p. 261-268. **2002**.
34. Scolnick, E.M. and C.T. Caskey, *Peptide Chain Termination, V. The Role Of Release Factors In Mrna Terminator Codon Recognition*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States of America, 64(4): p. 1235-1241. **1969**.
35. Ranjan, N. and M.V. Rodnina, *Thio-Modification of tRNA at the Wobble Position as Regulator of the Kinetics of Decoding and Translocation on the Ribosome*. Journal of the American Chemical Society, 139(16): p. 5857-5864. **2017**.
36. Schwämmle, V., T. Verano-Braga, and P. Roepstorff, *Computational and statistical methods for high-throughput analysis of post-translational modifications of proteins*. Journal of Proteomics, 129: p. 3-15. **2015**.
37. Mann, M. and O.N. Jensen, *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nature Biotechnology, 21: p. 255. **2003**.
38. Cain, J.A., N. Solis, and S.J. Cordwell, *Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria*. Journal of Proteomics, 97: p. 265-286. **2014**.
39. Huhtinen, A., et al., *Gene expression profiles and signaling mechanisms in $\alpha 2B$ -adrenoceptor-evoked proliferation of vascular smooth muscle cells*. BMC Systems Biology, 11(1): p. 65. **2017**.
40. Tompa, P., et al., *A Million Peptide Motifs for the Molecular Biologist*. Molecular Cell, 55(2): p. 161-169. **2014**.

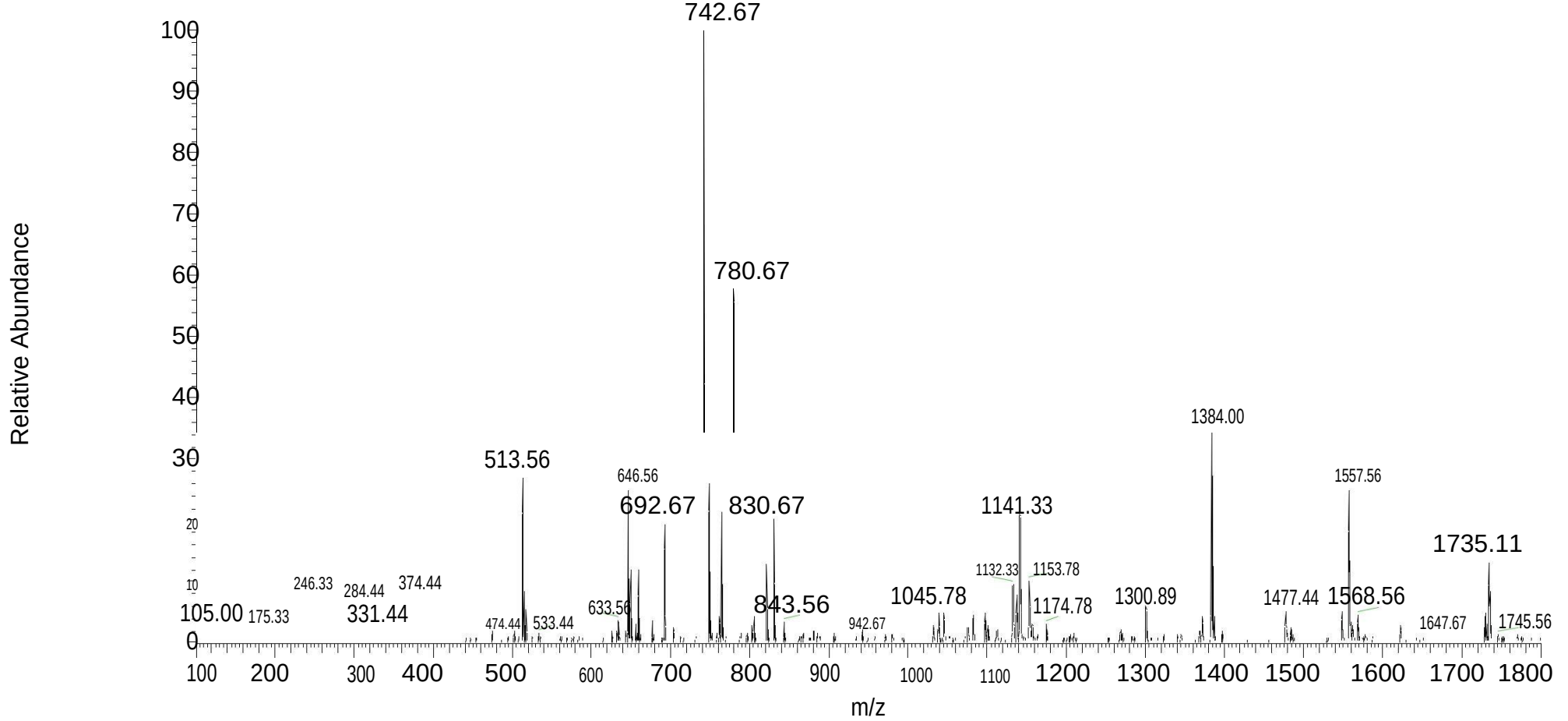
41. Kirkpatrick, D.S., S.A. Gerber, and S.P. Gygi, *The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications*. *Methods*, 35(3): p. 265-273. **2005**.
42. Ettore, A., David, A., Kazuyasu, S., *Proteomics in Functional Genetics*, France:p.199.,**2000**.
43. Fuhs, S.R. and T. Hunter, *pHisphorylation: the emergence of histidine phosphorylation as a reversible regulatory modification*. *Curr Opin Cell Biol*, 45: p. 8-16. **2017**.
44. Wan, H., et al., *Zirconia layer coated mesoporous silica microspheres used for highly specific phosphopeptide enrichment*. *Talanta*, 82(5): p. 1701-7. **2010**.
45. Cohen, P., *The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update*. *Trends in Biochemical Sciences*,. 25(12): p. 596-601. **2000**.
46. Hunter, T. and J.A. Cooper, *Protein-Tyrosine Kinases*. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1): p. 897-930. **1985**.
47. McLachlin, D.T. and B.T. Chait, *Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(5): p. 591-602. **2001**.
48. Veenstra, T.D., *Electrospray ionization mass spectrometry in the study of biomolecular non-covalent interactions*. *Biophysical Chemistry*, 79(2): p. 63-79. **1999**.
49. Witze, E.S., et al., *Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry*. *Nature Methods* 4: p. 798. **2007**.
50. Zweigenbaum, J., *Mass Spectrometry in Food* 747,USA,:p.66,**2011**..
51. Lipton, M.S., Pasa-Tolic, L., *Mass_Spectrometry*, UK,:p.131, **2008**.
52. Chapman, R.,*Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*:Vol 4 p.94, **1997**.
53. Barber, M., et al., *Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7): p. 325-327. **1981**.
54. Sporns, P. and D.C. Abell, *MALDI mass spectrometry for food analysis*. *Trends in Food Science & Technology*, 7(6): p. 187-190. **1996**.
55. Szajli, E., T. Feher, and K.F. Medzihradszky, *Investigating the quantitative nature of Maldi-Tof Ms*. *Mol Cell Proteomics*, 7(12): p. 2410-8. **2008**.
56. Moini, M., *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry By Chhabil Dass (University of Memphis)*. *J. Wiley & Sons, Inc.: New York*. 123(33): p. 8163-8164. **2001**.

57. Hoffman, E., and Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications* Belgium:p.318, **2007**.
58. Wang, J.P., et al., *Phosphorylation is an on/off switch for 5-hydroxyconiferaldehyde - methyltransferase activity in poplar monolignol biosynthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(27): p. 8481. **2015**.
59. Glish, G.L. and R.W. Vachet, *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nature Reviews Drug Discovery, 2: p. 140. **2003**.
60. Schoofs, L. and G. Baggerman, *Peptidomics in Drosophila melanogaster*. Briefings in Functional Genomics,. 2(2): p. 114-120. **2003**.
61. Blackburn, K. and M.B. Goshe, *Challenges and strategies for targeted phosphorylation site identification and quantification using mass spectrometry analysis*. Briefings in Functional Genomics, 8(2): p. 90-103. **2009**.
62. Jiang, W., et al., *Preparation of lamellar magnesium hydroxide nanoparticles via precipitation method*. Powder Technology, 191(3): p. 227-230. **2009**.
63. Nuhse, T.S., et al., *Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database*. Plant Cell, 16(9): p. 2394-405. **2004**.
64. Azarpazhooh, A. and H. Limeback, *Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature*. J Am Dent Assoc, 139(7): p. 915-24; quiz 994-5. **2008**.

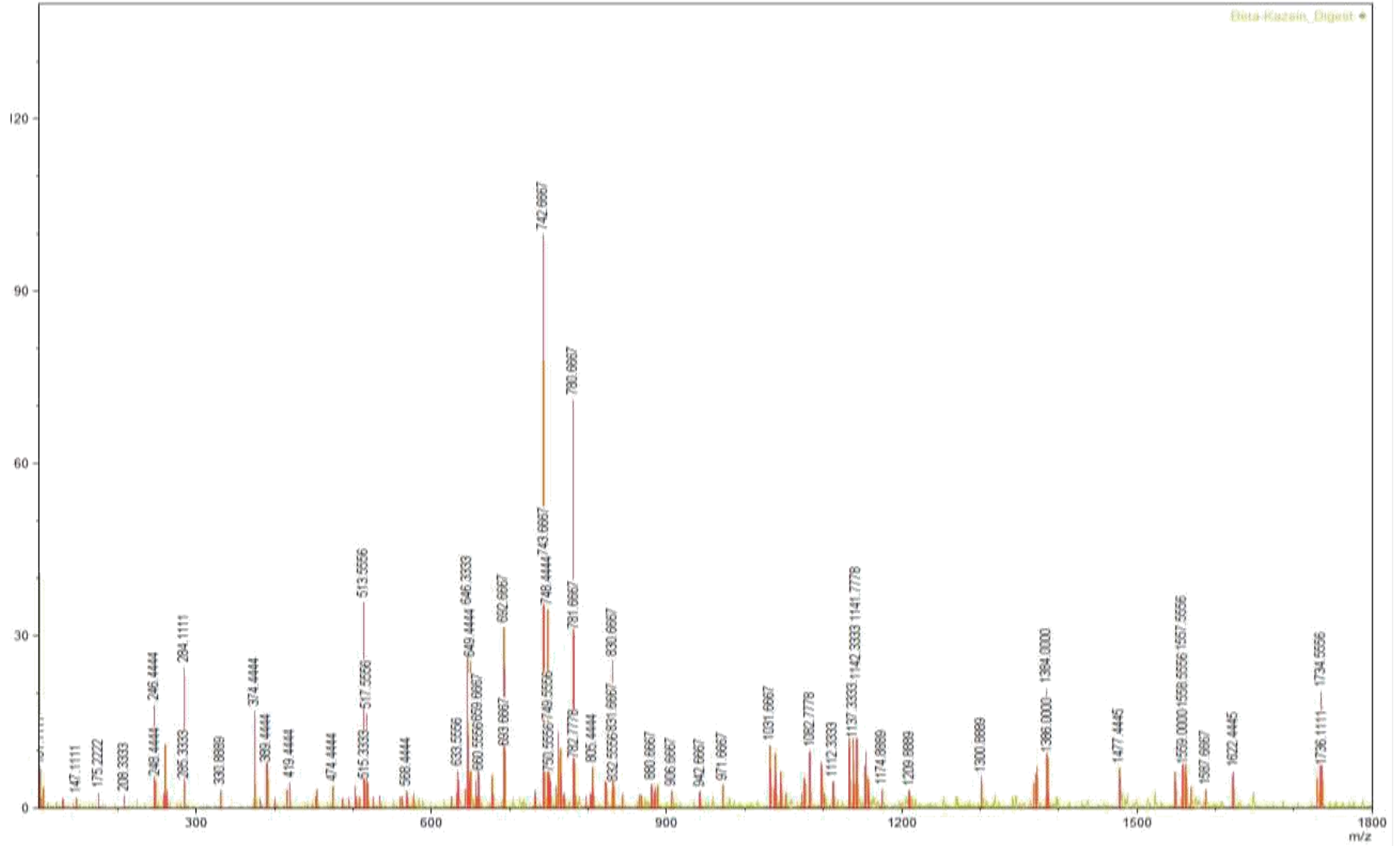
7. EKLER

digest_betacasein #18 RT: 0.48 AV: 1 NL: 1.17E7

T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



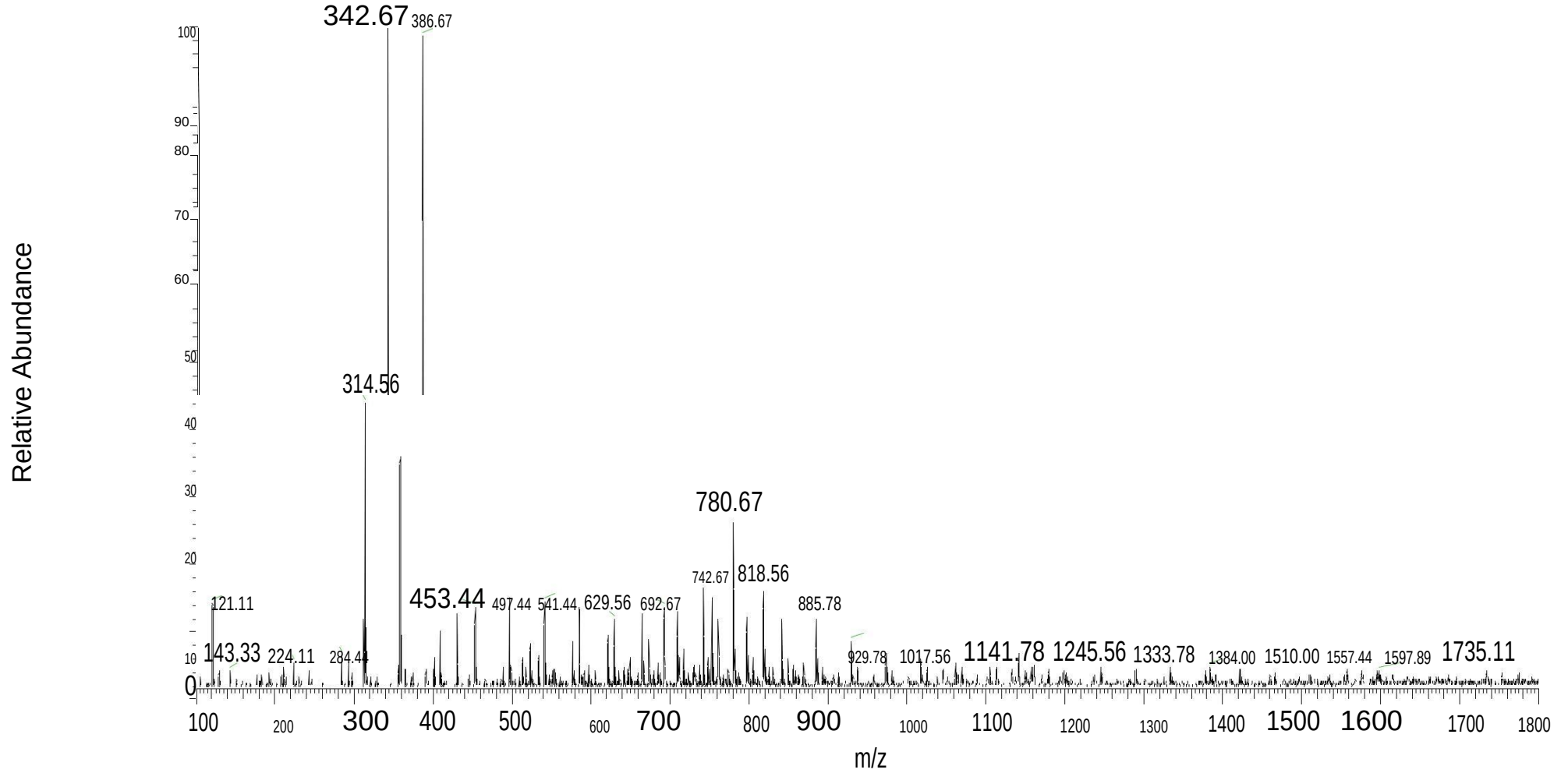
Şekil 1. Tripsin ile Parçalanmış β -kazein'in ESI Kütle Spektrumu.



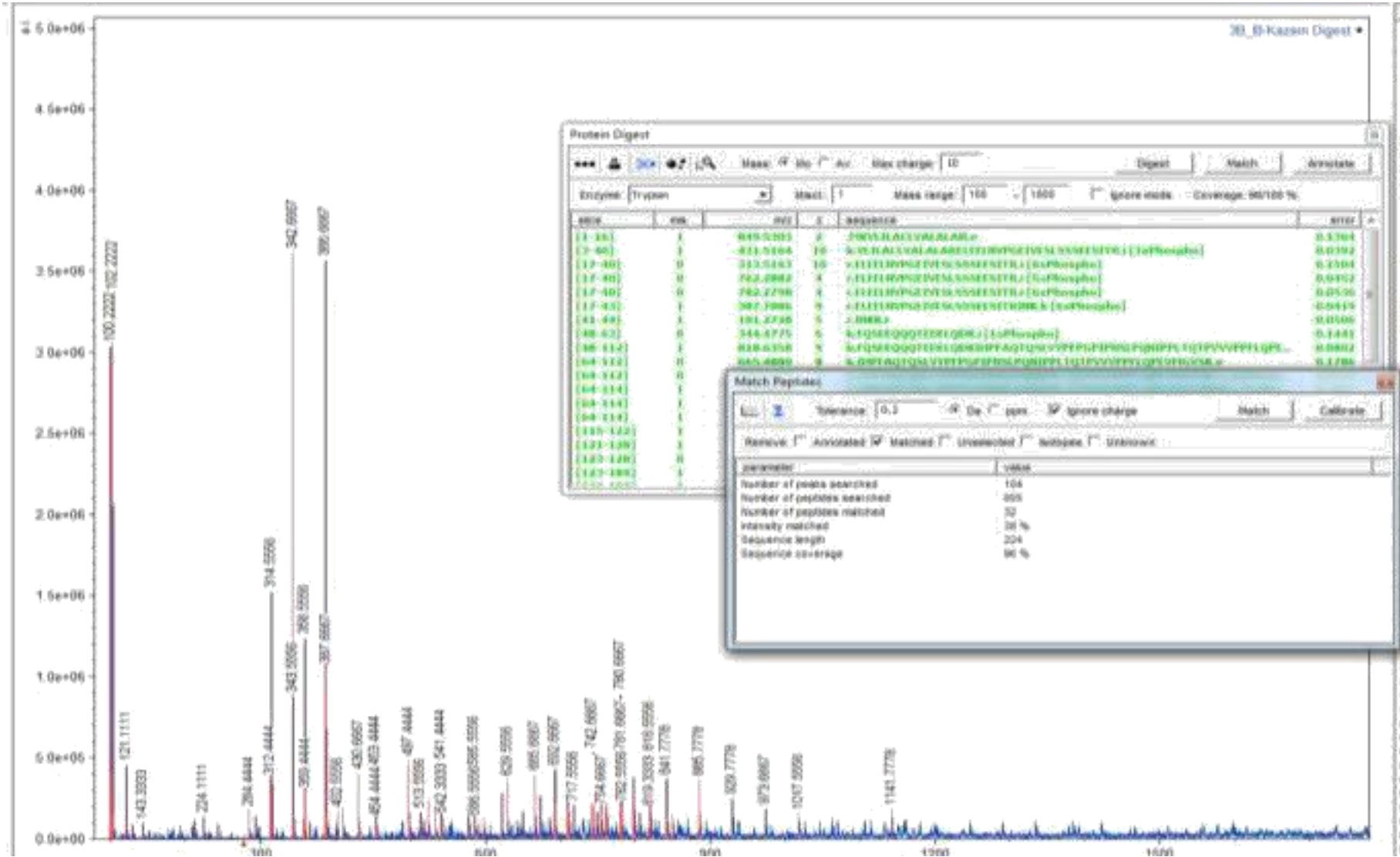
Şekil 2. β -kazein'in ESI-MS Spektrumunun mMass Yazılımındaki Görüntüsü.

3B_betacasein #25 RT: 0.68 AV: 1 NL: 3.62E6

T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



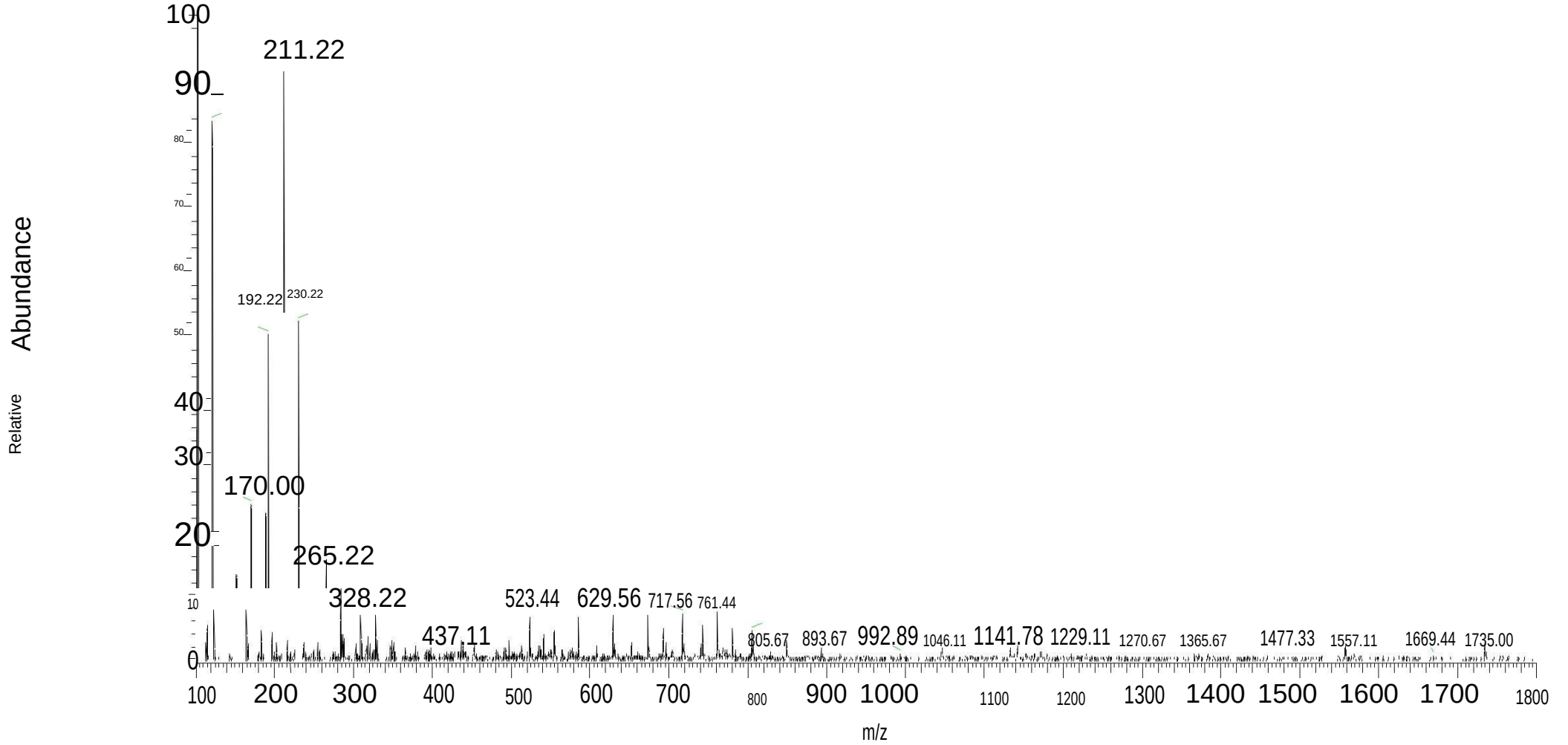
Şekil 3. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄@TEOS (3B kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-Kazein peptitlerinin ESI Kütle Spektrumu.



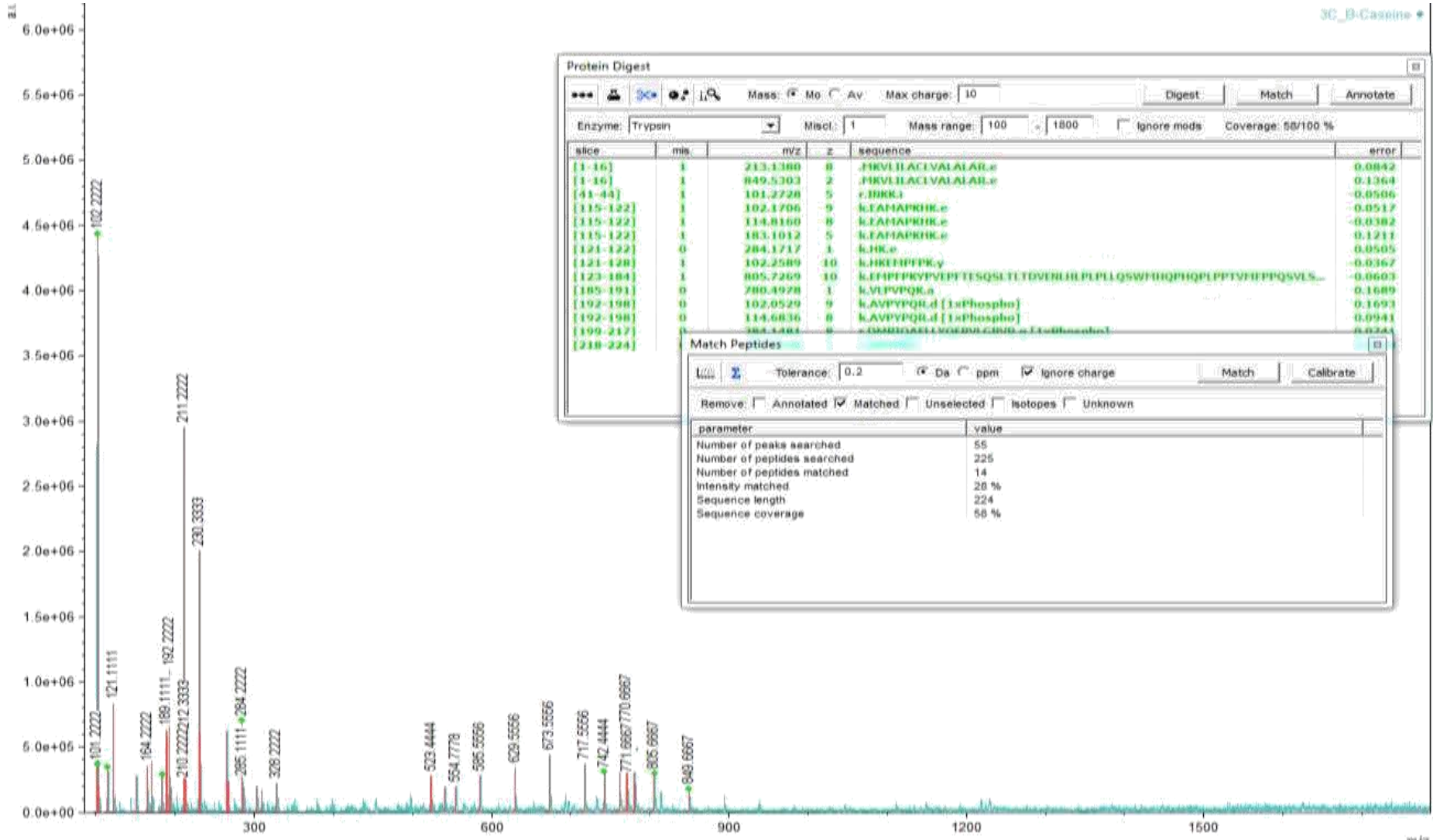
Şekil 4. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ kullanılarak zenginleştirilen β -Kazein fosfopeptitlerinin Eşleşme Yüzdeleri.

3C_betacasein #107 RT: 3.02 AV: 1 NL: 3.32E6

T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



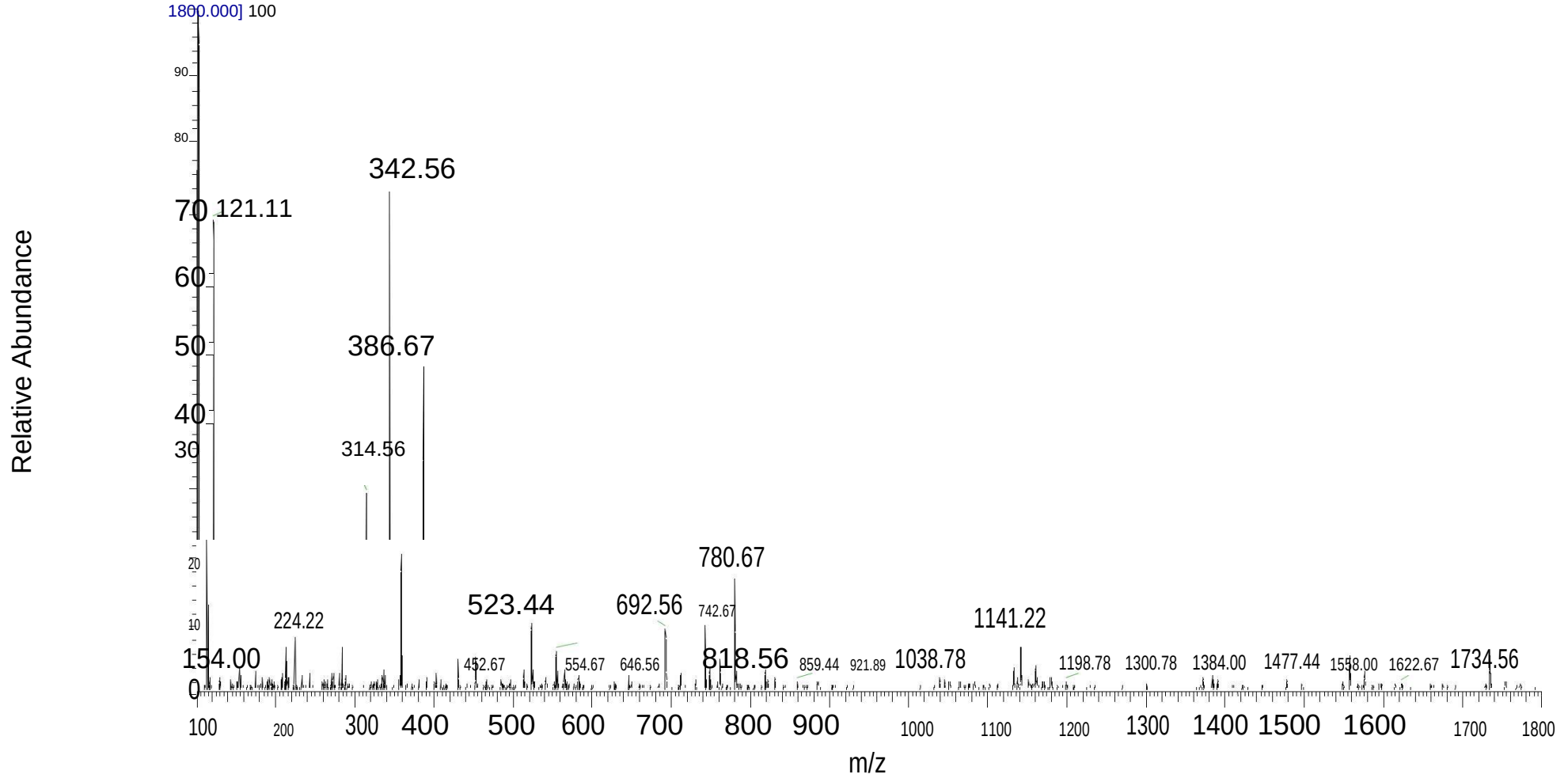
Şekil 5. C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS (3C kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-Kazein peptitlerinin ESI-MS Kütle Spektrumu.



Şekil 6. C₆H₆MgO₇-HNO₃@TEOS (3C kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β-Kazein fosfopeptitlerinin Eşleşme Yüzdeleri.

3D_betacasein #108 RT: 3.04 AV: 1 NL: 1.87E6

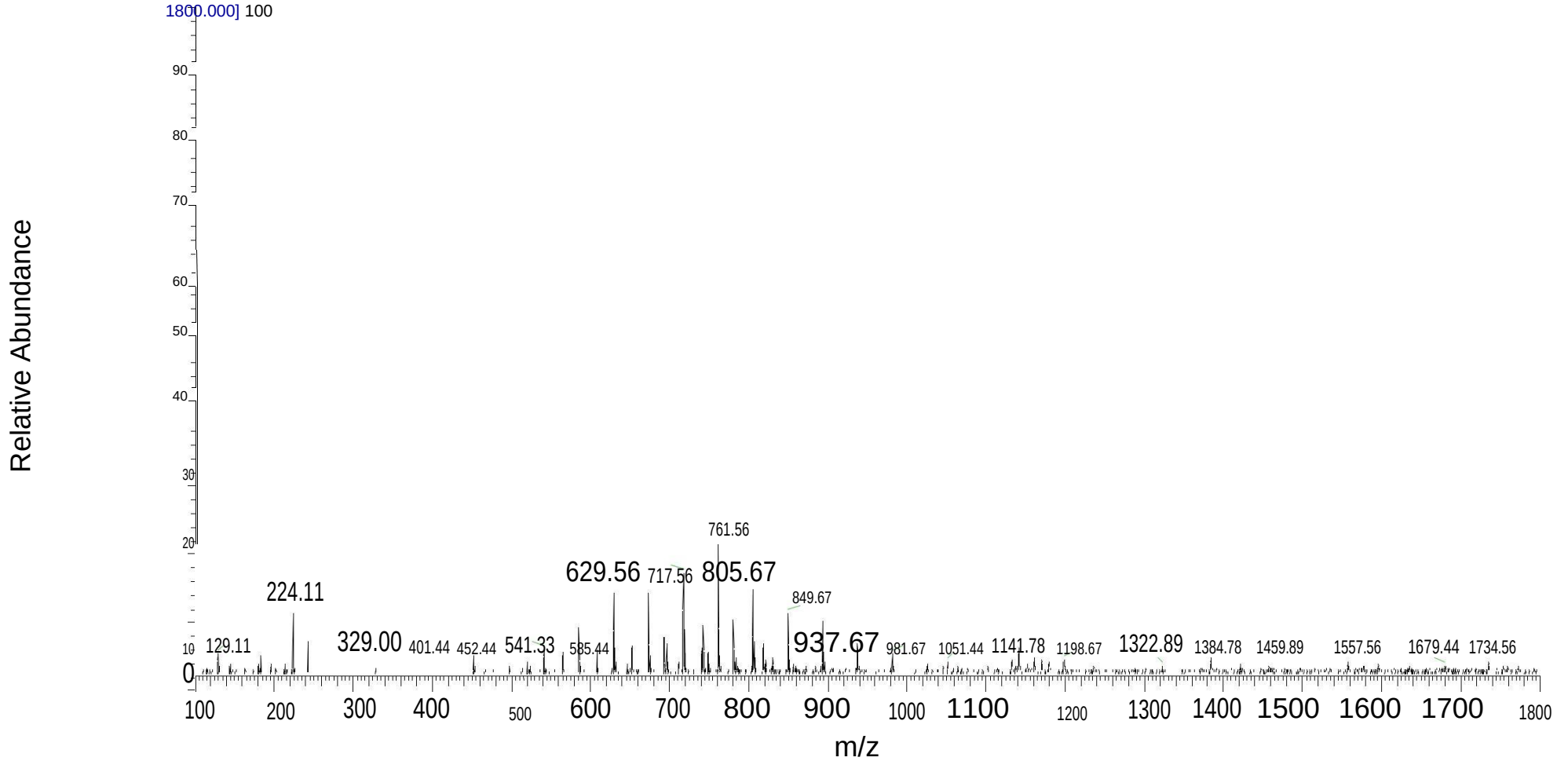
T: + p ESI Q1MS [100.000-



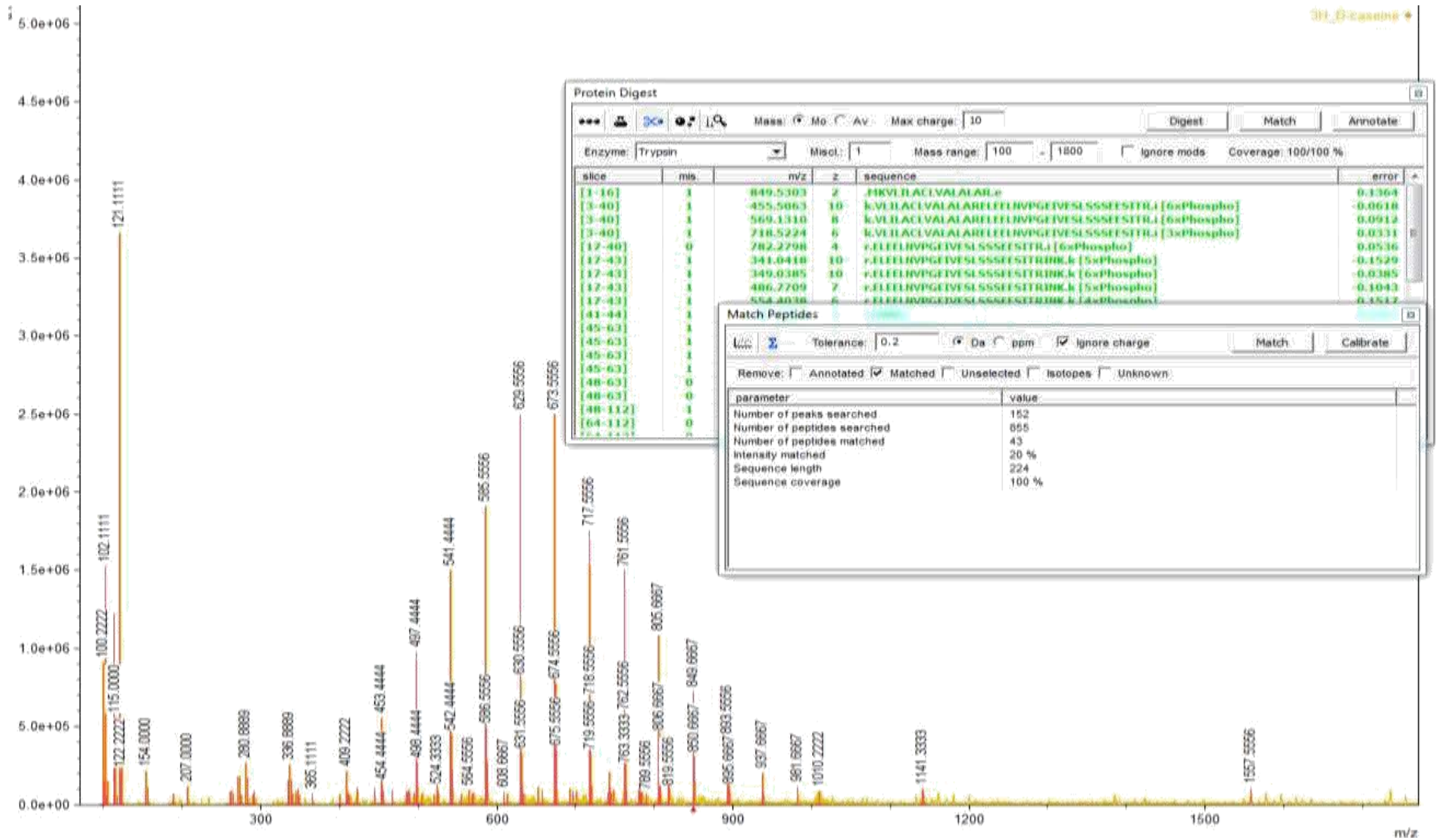
Şekil 7. $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ (3D kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β -Kazein peptitlerinin ESI Kütle Spektrumu.

3H_betacasein #23 RT: 0.63 AV: 1 NL: 3.94E6

T: + p ESI Q1MS [100.000-



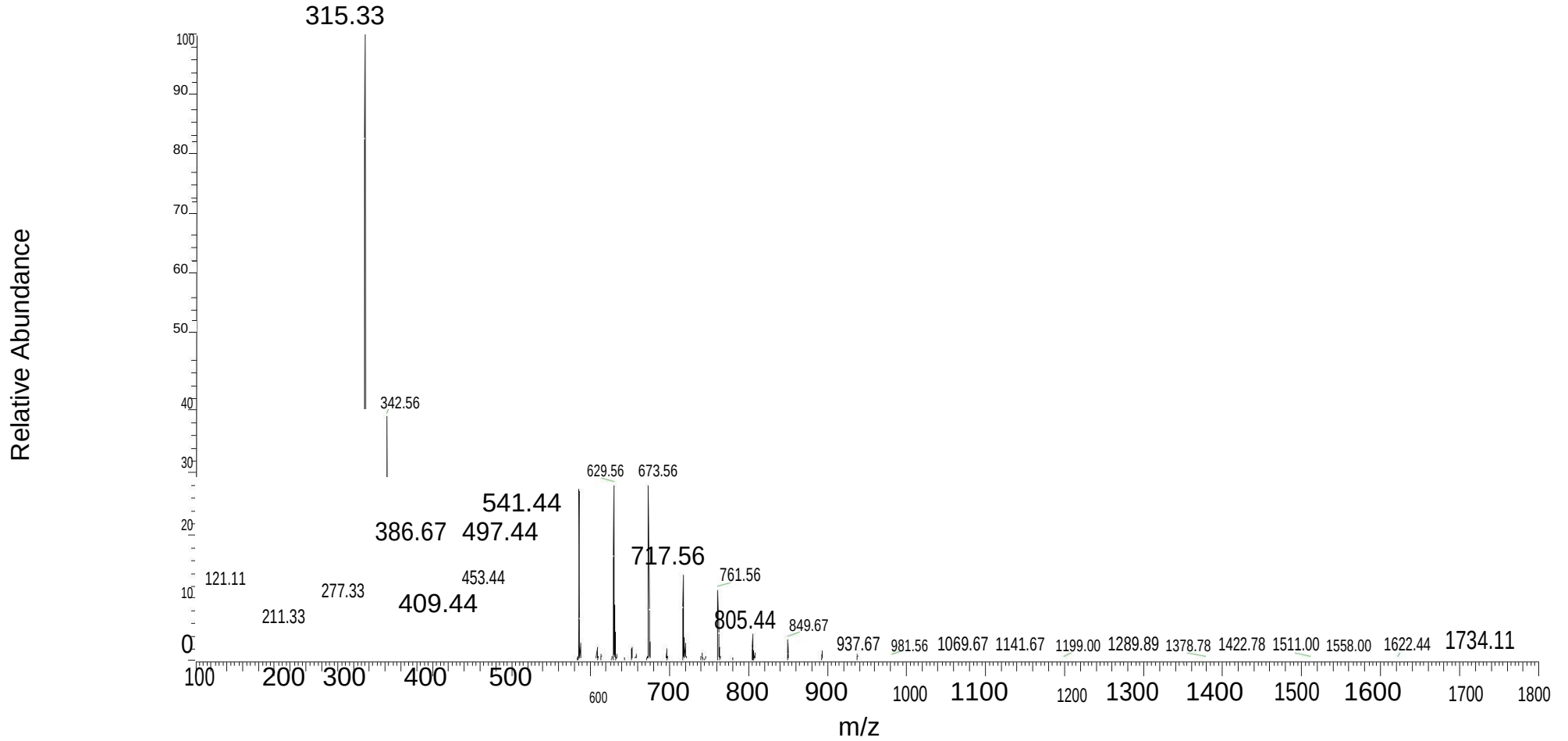
Şekil 9. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-Kazein peptitlerinin ESI Kütle Spektrumu.



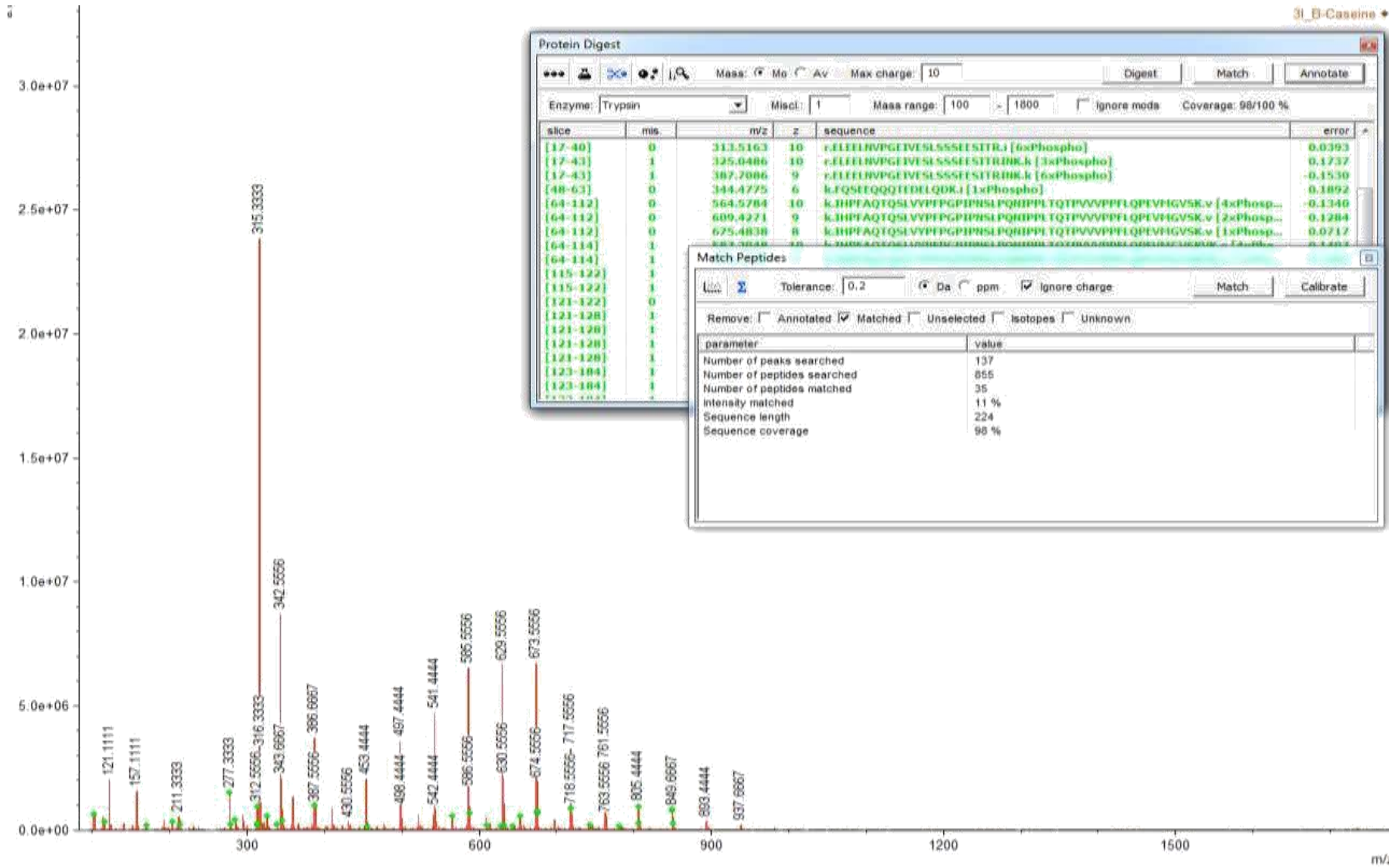
Şekil 10. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu Sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilen β-Kazein fosfopeptitlerinin Eşleşme Yüzdeleri.

3I_betacasein #22 RT: 0.60 AV: 1 NL: 2.39E7

T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



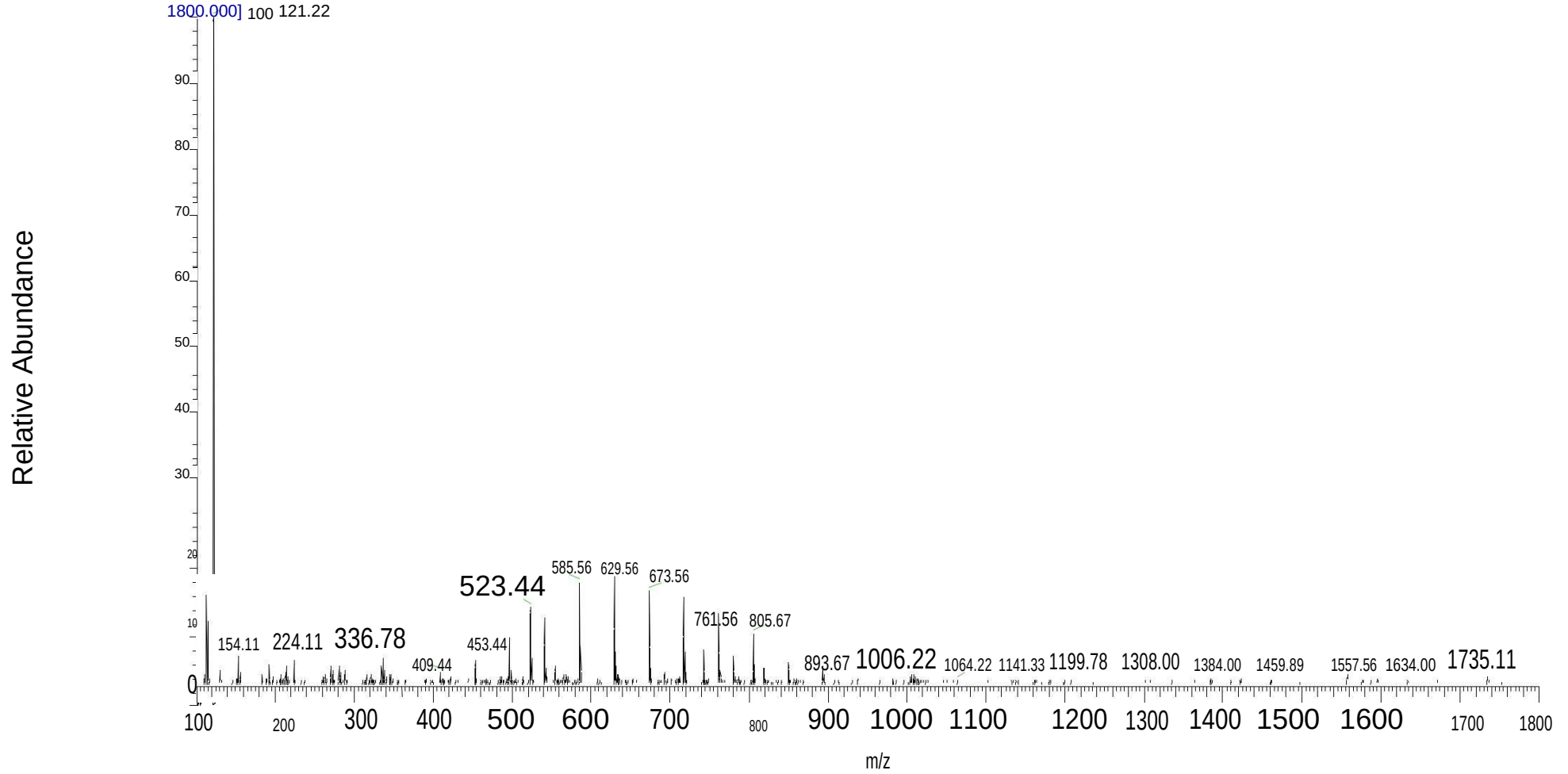
Şekil 11. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β-Kazein peptitlerinin ESI Kütle Spektrumu.



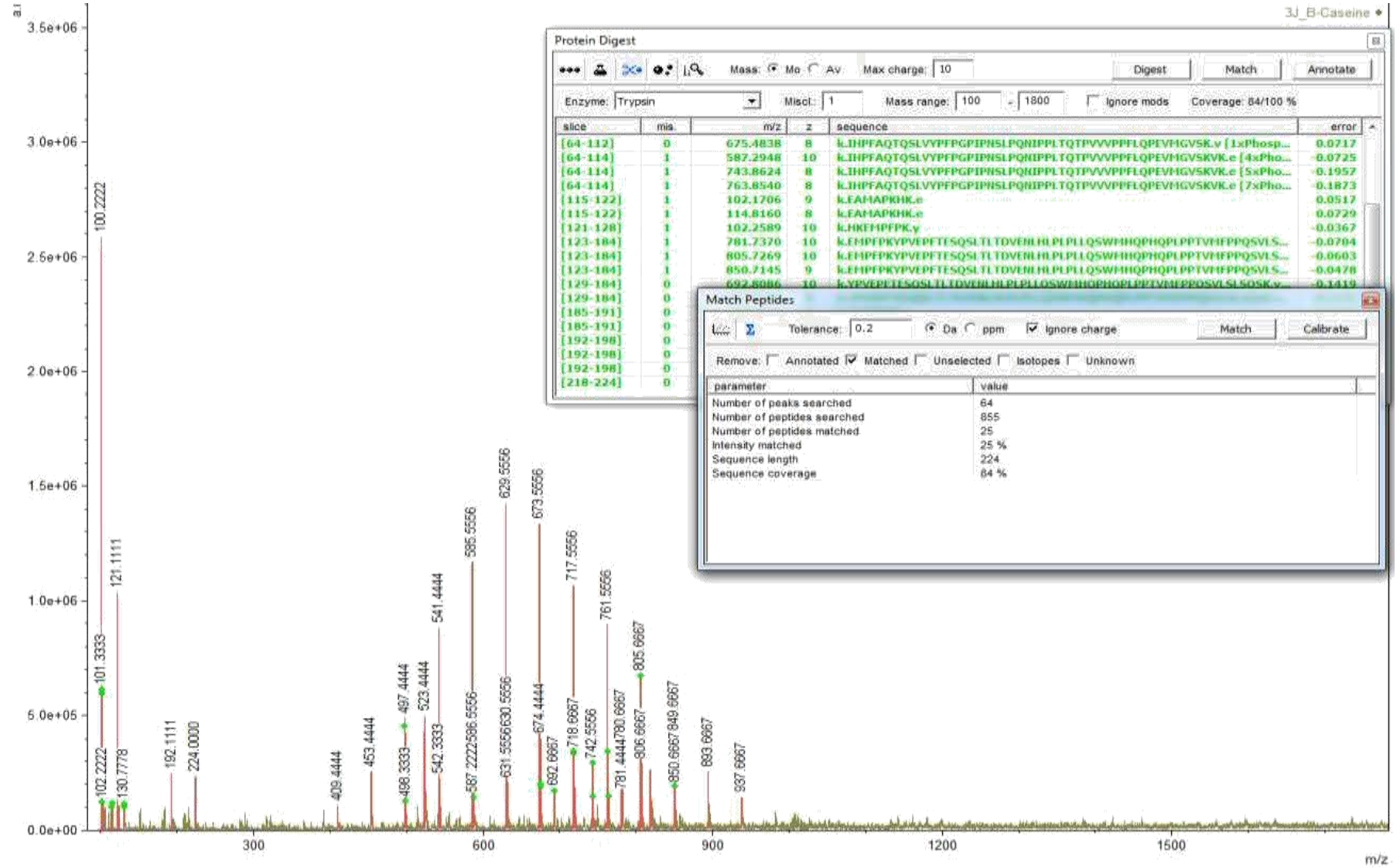
Şekil 12. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β-Kazein fosfopeptitlerinin Eşleşme Yüzdeleri.

3J_Betacasein #22 RT: 0.60 AV: 1 NL: 5.58E6

T: + p ESI Q1MS [100.000-



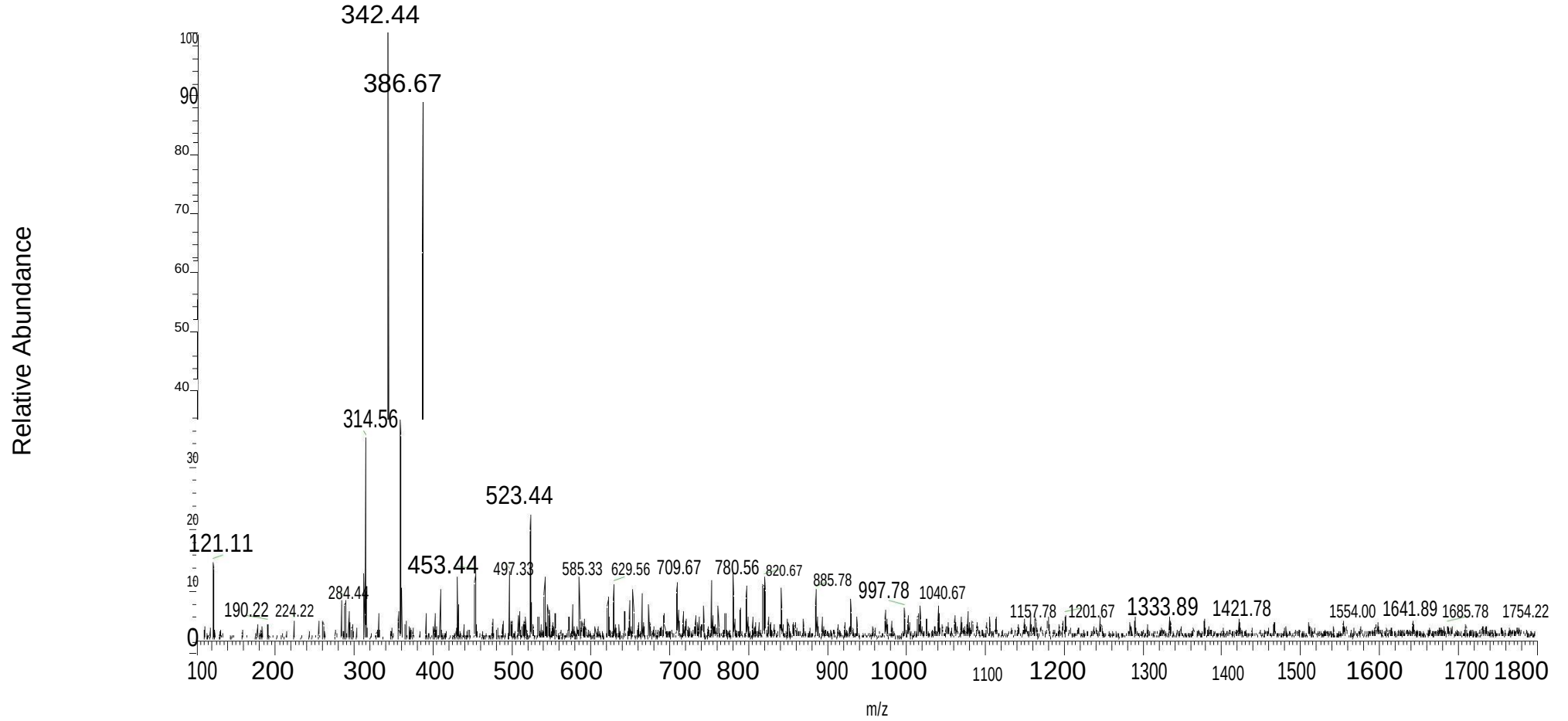
Şekil 13. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4-PEG@TEOS$ (3J kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilmiş β -Kazein peptitlerinin ESI Kütle Spektrumu.



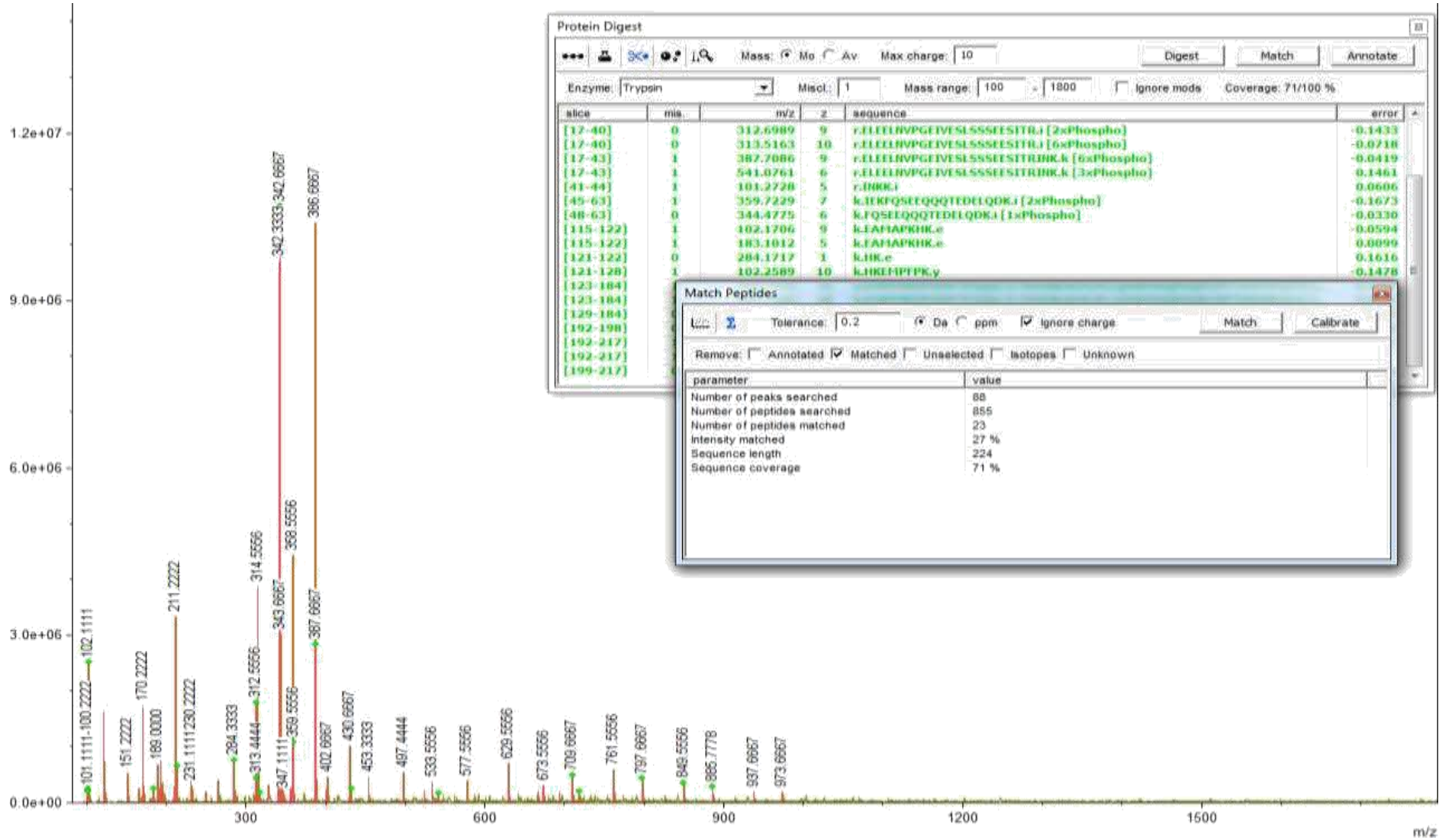
Şekil 14. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4-PEG@TEOS$ (3J kodlu Sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilen β -Kazein fosfopeptitlerinin Eşleşme Yüzdeleri.

3B_betacasein_bsa #23 RT: 0.63 AV: 1 NL: 3.20E6

T: +p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



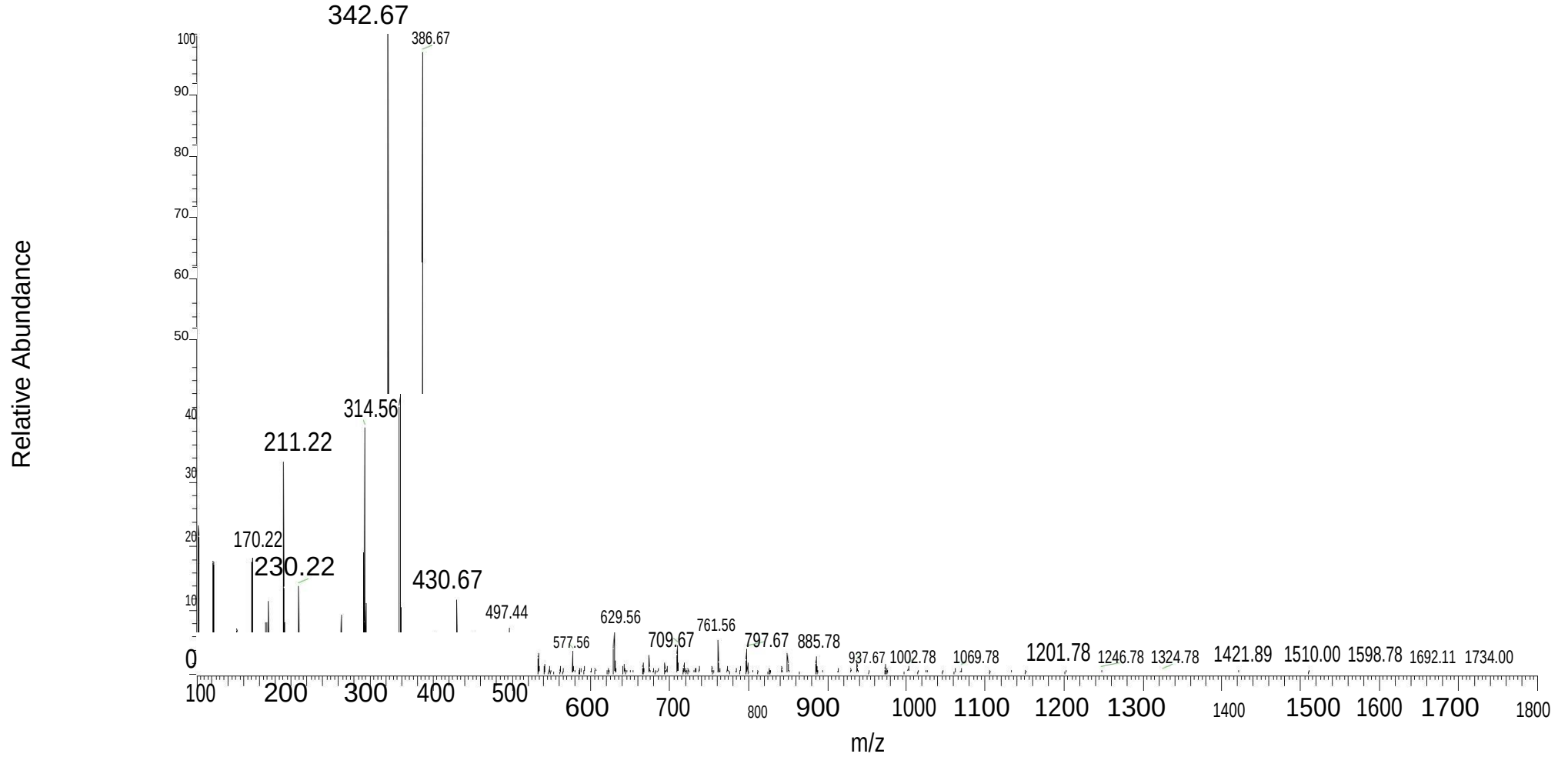
Şekil 15. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β -kazein/BSA peptit karışımının ESI Kütle Spektrumu.



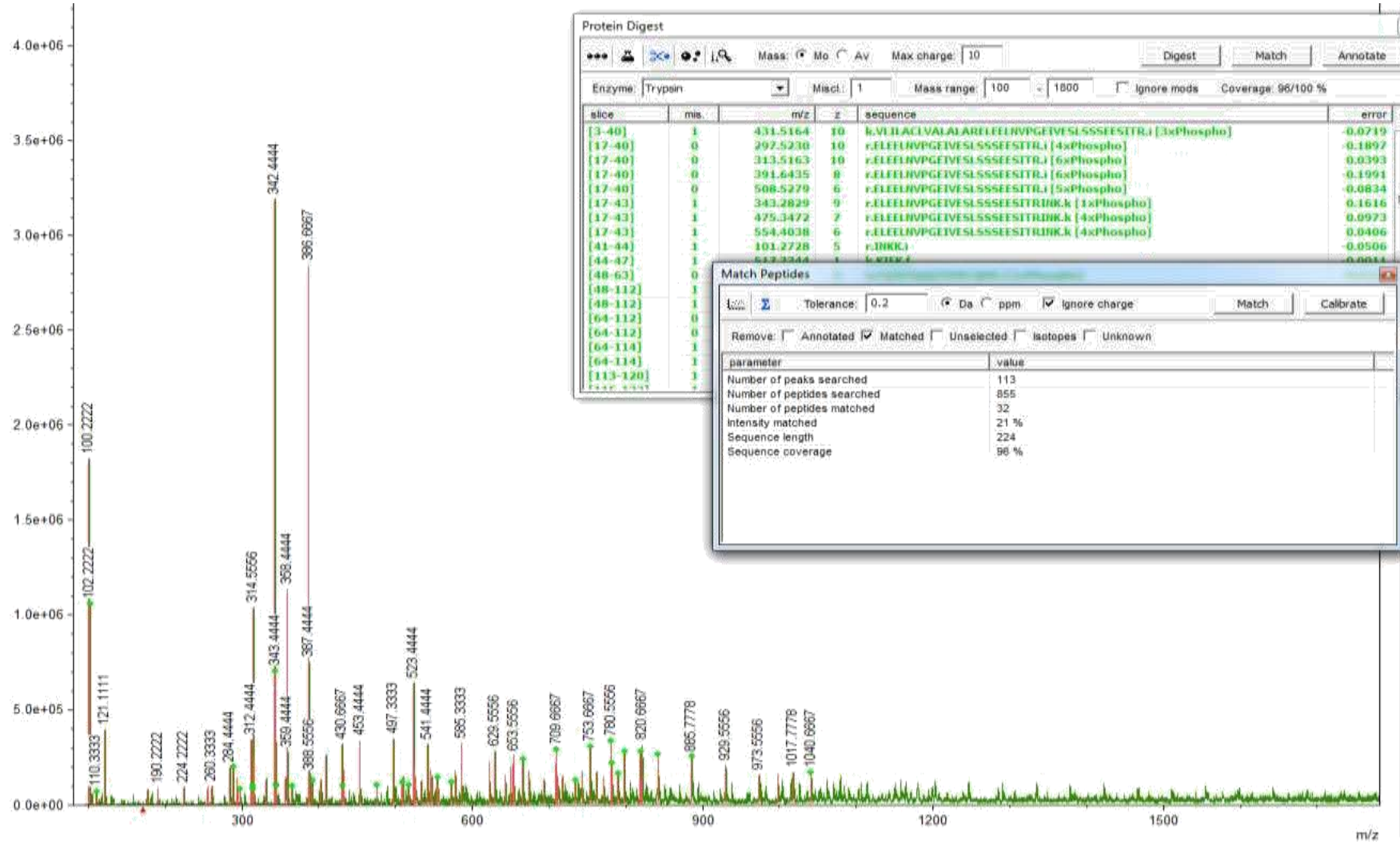
Şekil 16. $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β -kazein/BSA peptit karışımının fosfopeptit eşleşme Yüzdesi.

3C_betacasein_bsa #21 RT: 0.57 AV: 1 NL: 1.07E7

T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



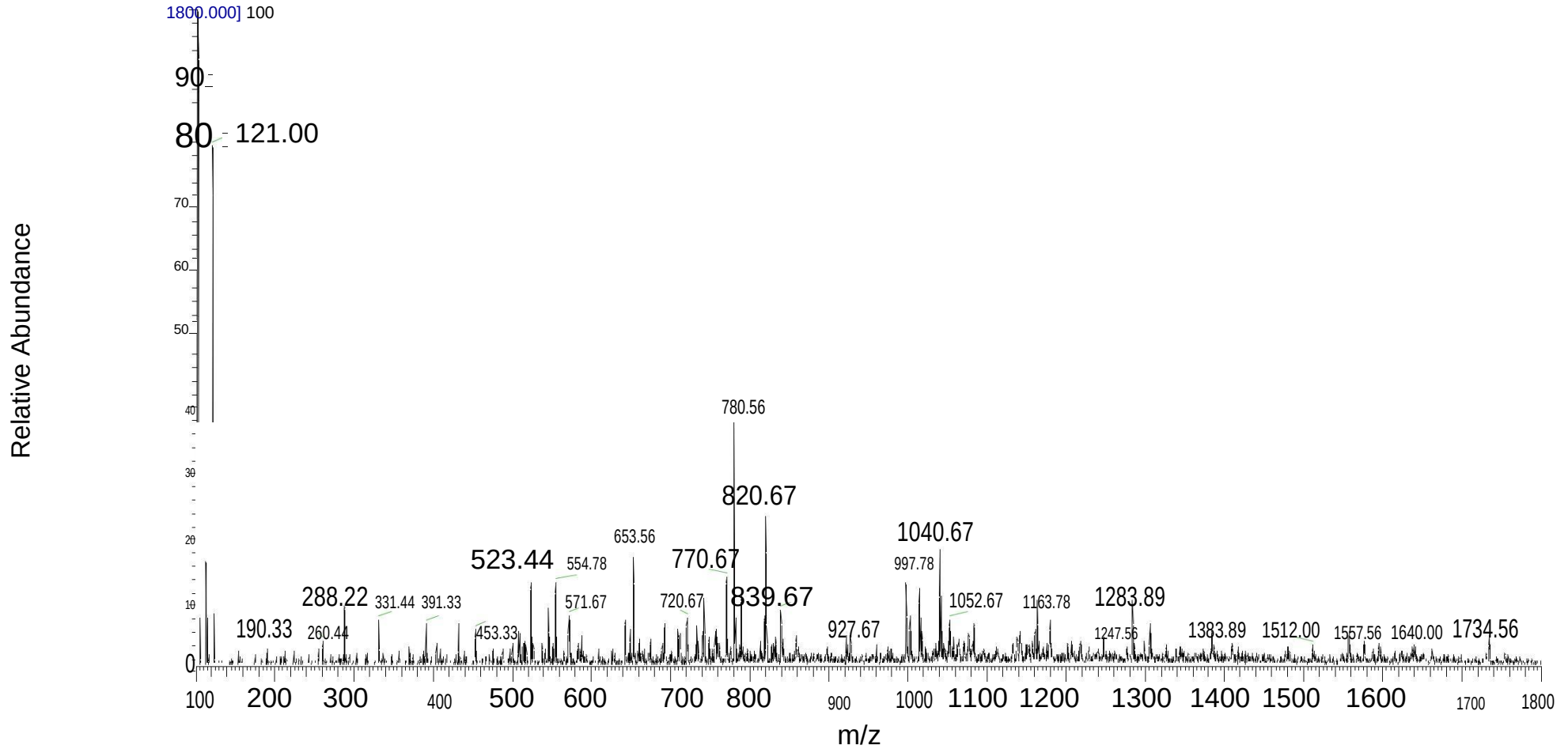
Şekil 17. $C_6H_6MgO_7-HNO_3$ @TEOS (3C kodlu Sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilen β -kazein/BSA peptit karışımının ESI Kütle Spektrumu.



Şekil 18. $C_6H_6MgO_7-HNO_3$ @TEOS (3C kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β -kazein/BSA peptit karışımının fosfopeptit eşleşme Yüzdesi.

3D_betacasein_bsa #51 RT: 1.42 AV: 1 NL: 2.50E6

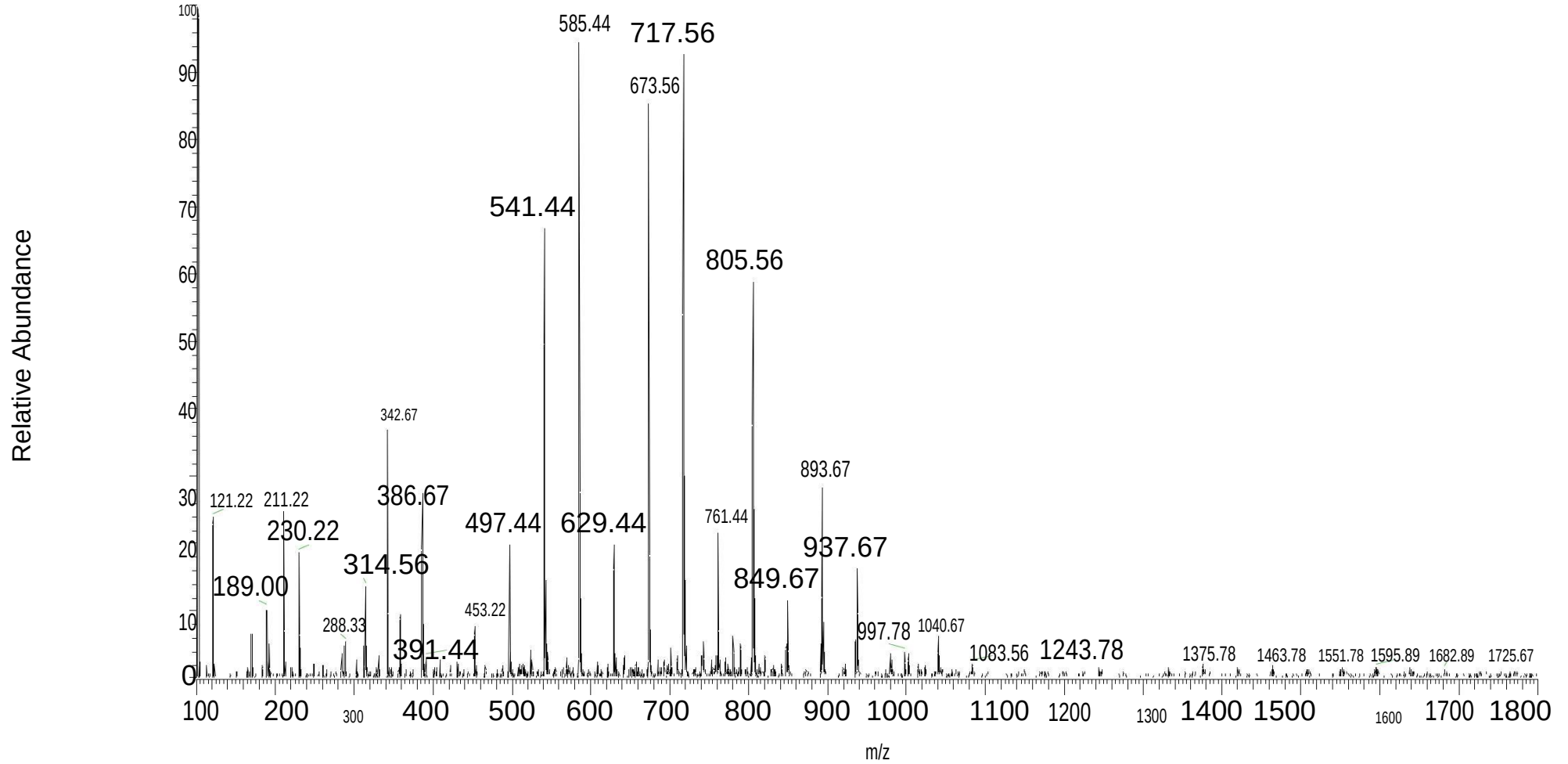
T: + p ESI Q1MS [100.000-



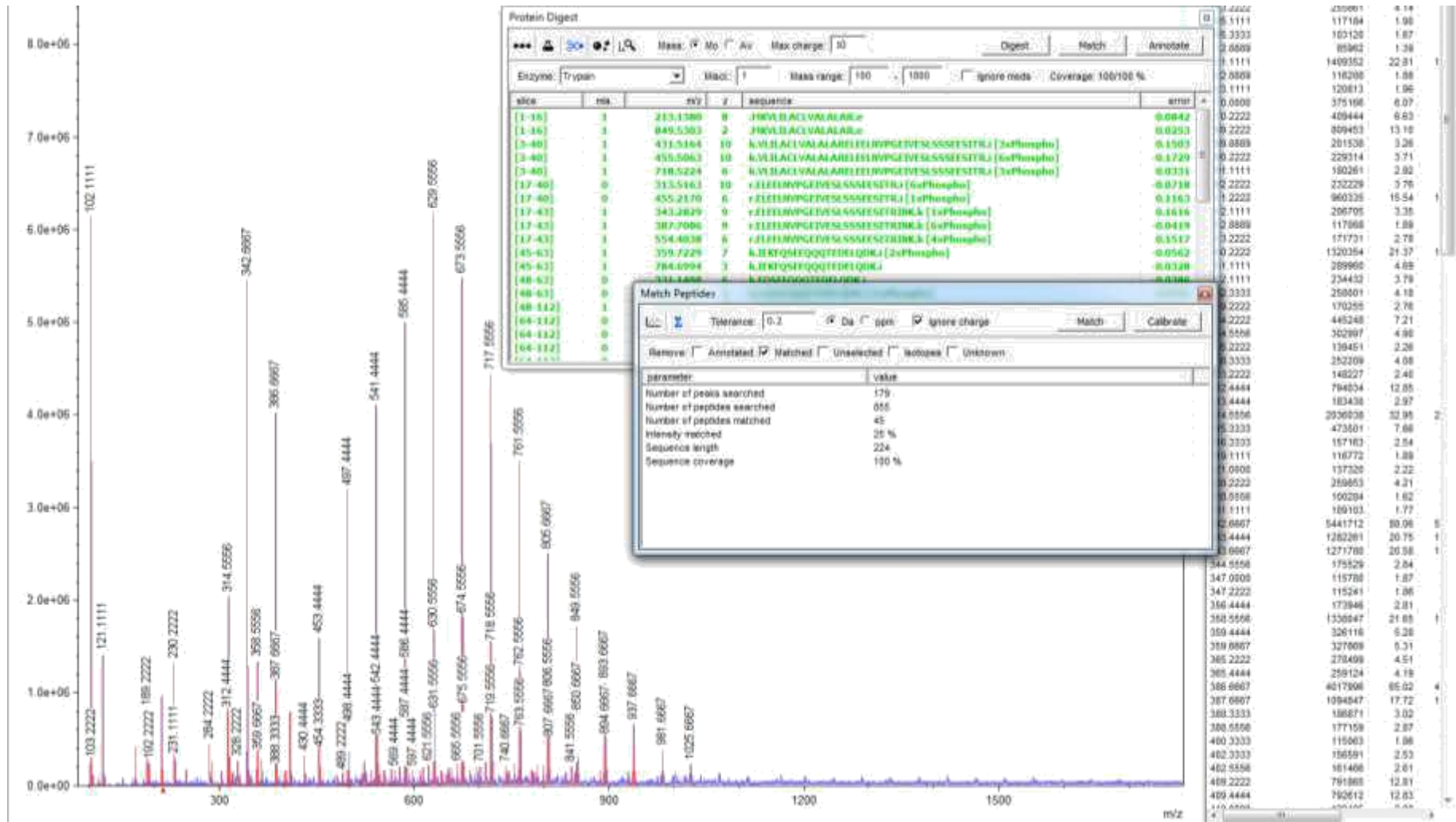
Şekil 19. $C_6H_6MgO_7-HCl@TEOS$ (3D kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β -kazein/BSA peptit karışımının ESI Kütle Spektrumu.

3H_betacasein_bsa #81 RT: 2.28 AV: 1 NL: 6.56E6

T: + p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



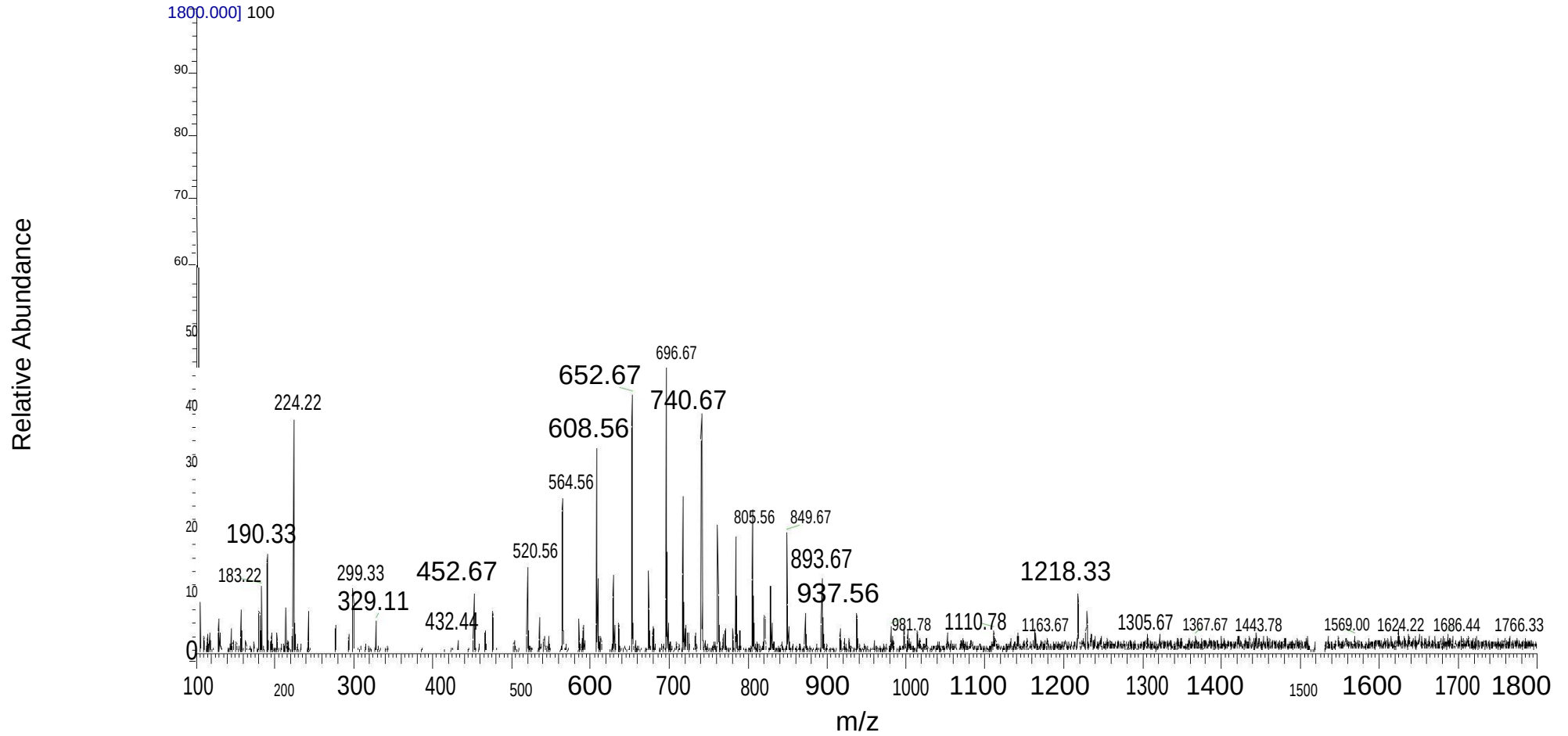
Şekil 21. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β-kazein/BSA peptit karışımının ESI Kütle Spektrumu.



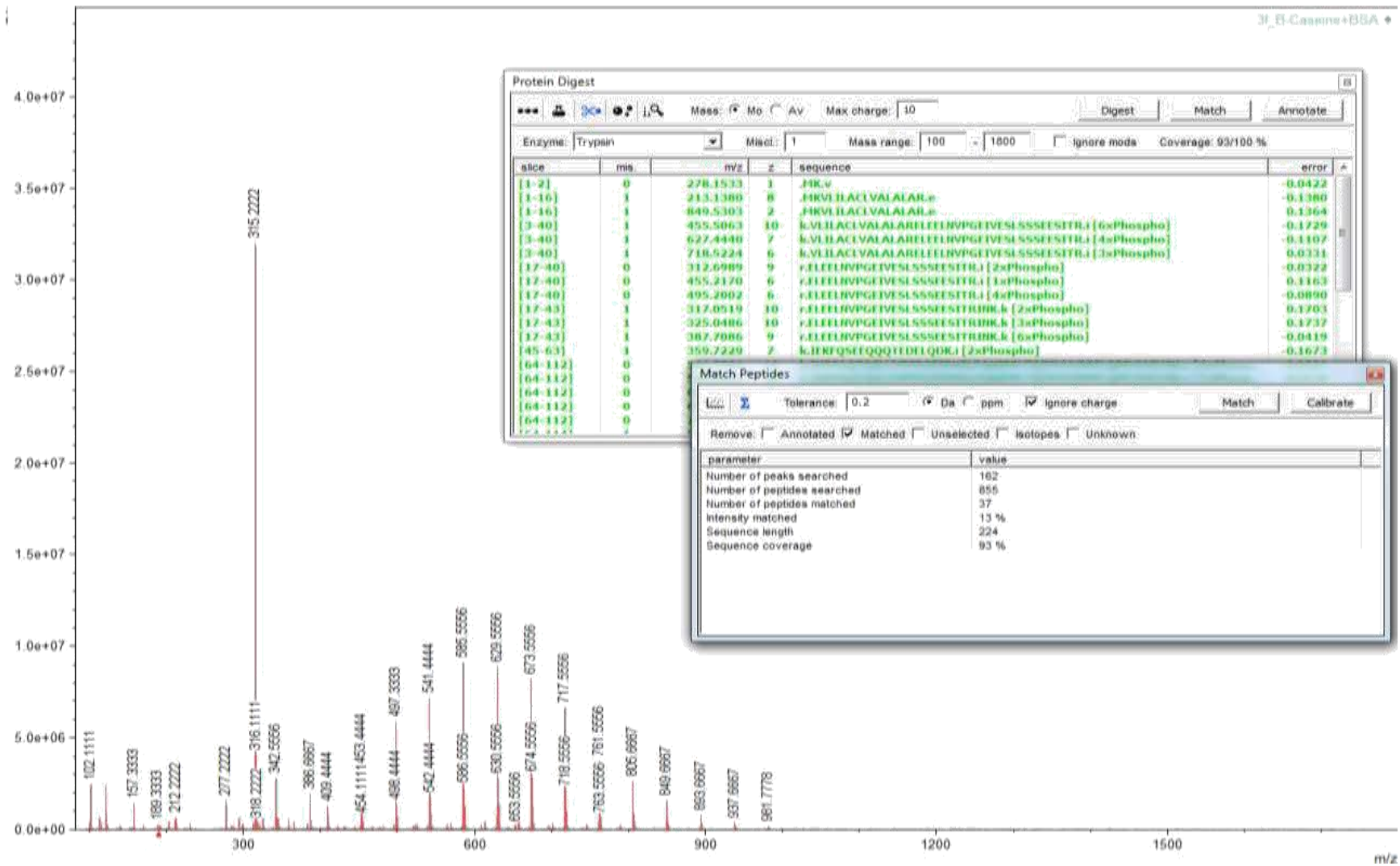
Şekil 22. C₆H₆MgO₇-HCl-PEG@TEOS (3H kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β-kazein/BSA peptit karışımının fosfopeptit eşleşme Yüzdesi.

3I_betacasein_bsa #18 RT: 0.48 AV: 1 NL: 1.75E6

T: + p ESI Q1MS [100.000-

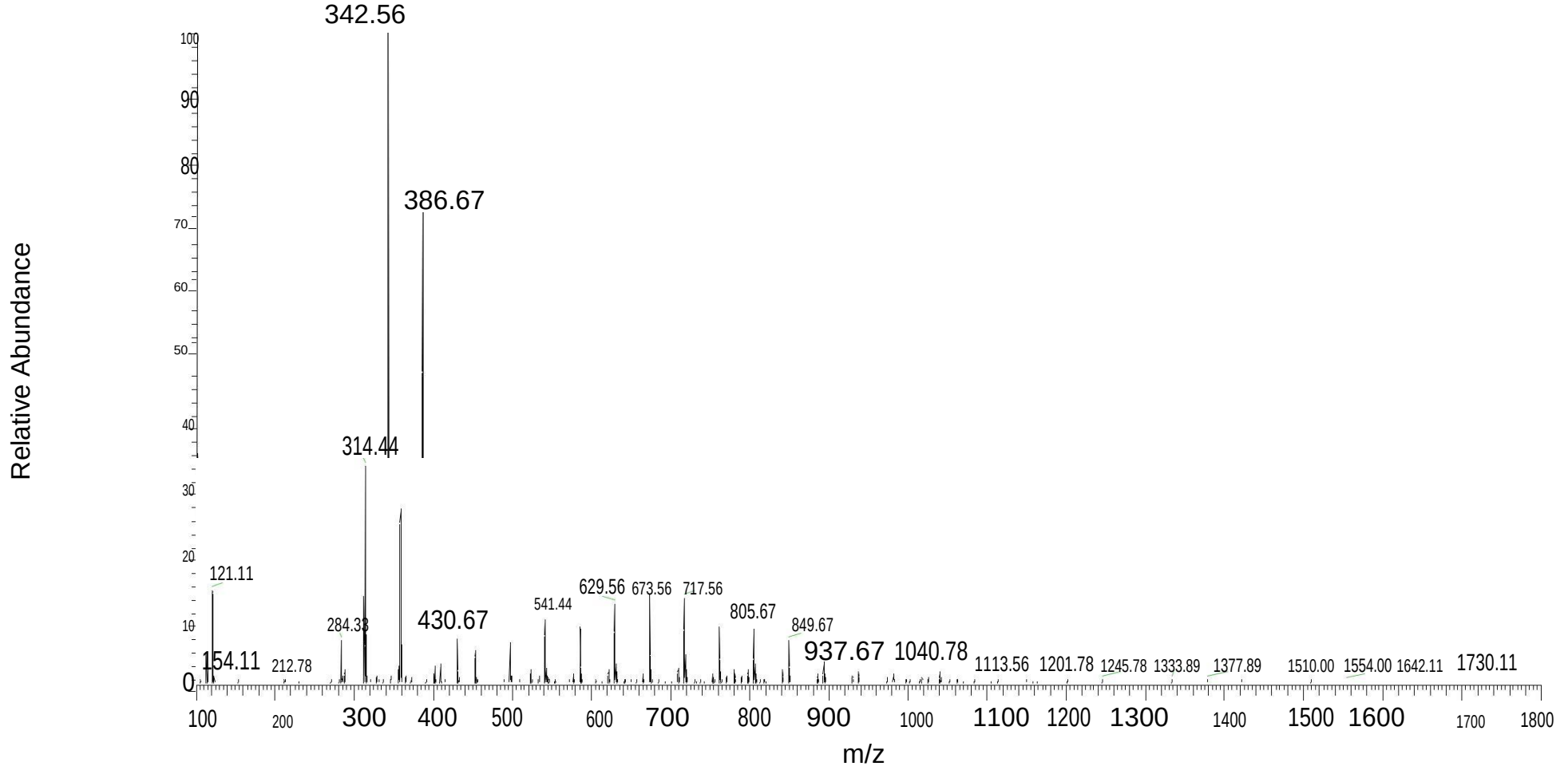


Şekil 23. $C_6H_6MgO_7$ -HNO₃-PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β -kazein/BSA peptit karışımının ESI Kütle Spektrumu.

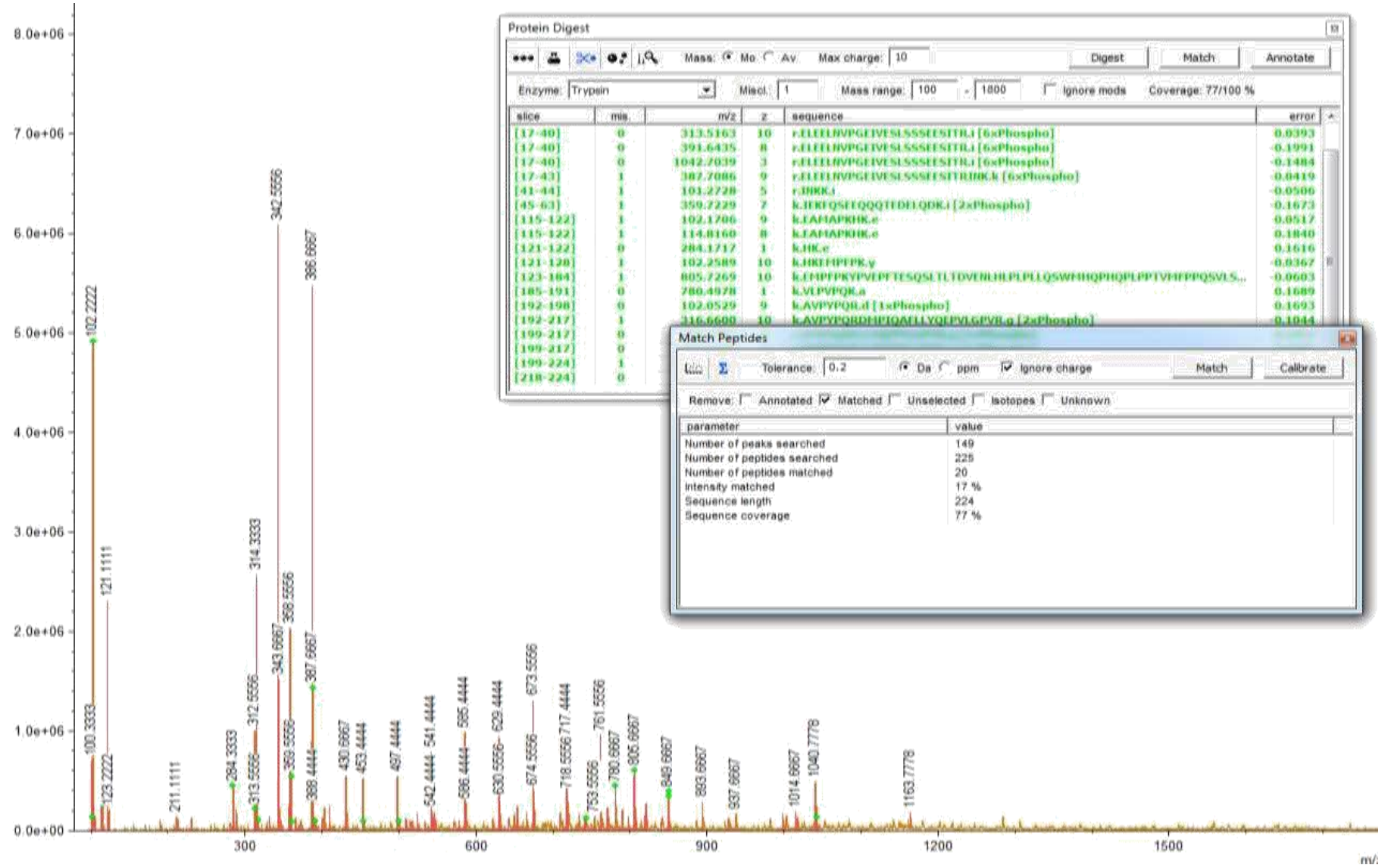


Şekil 24. C₆H₆MgO₇-HNO₃-PEG@TEOS (3I kodlu sol-jel) kullanılarak zenginleştirilen β-kazein/BSA peptit karışımının fosfopeptit eşleşme Yüzdesi.

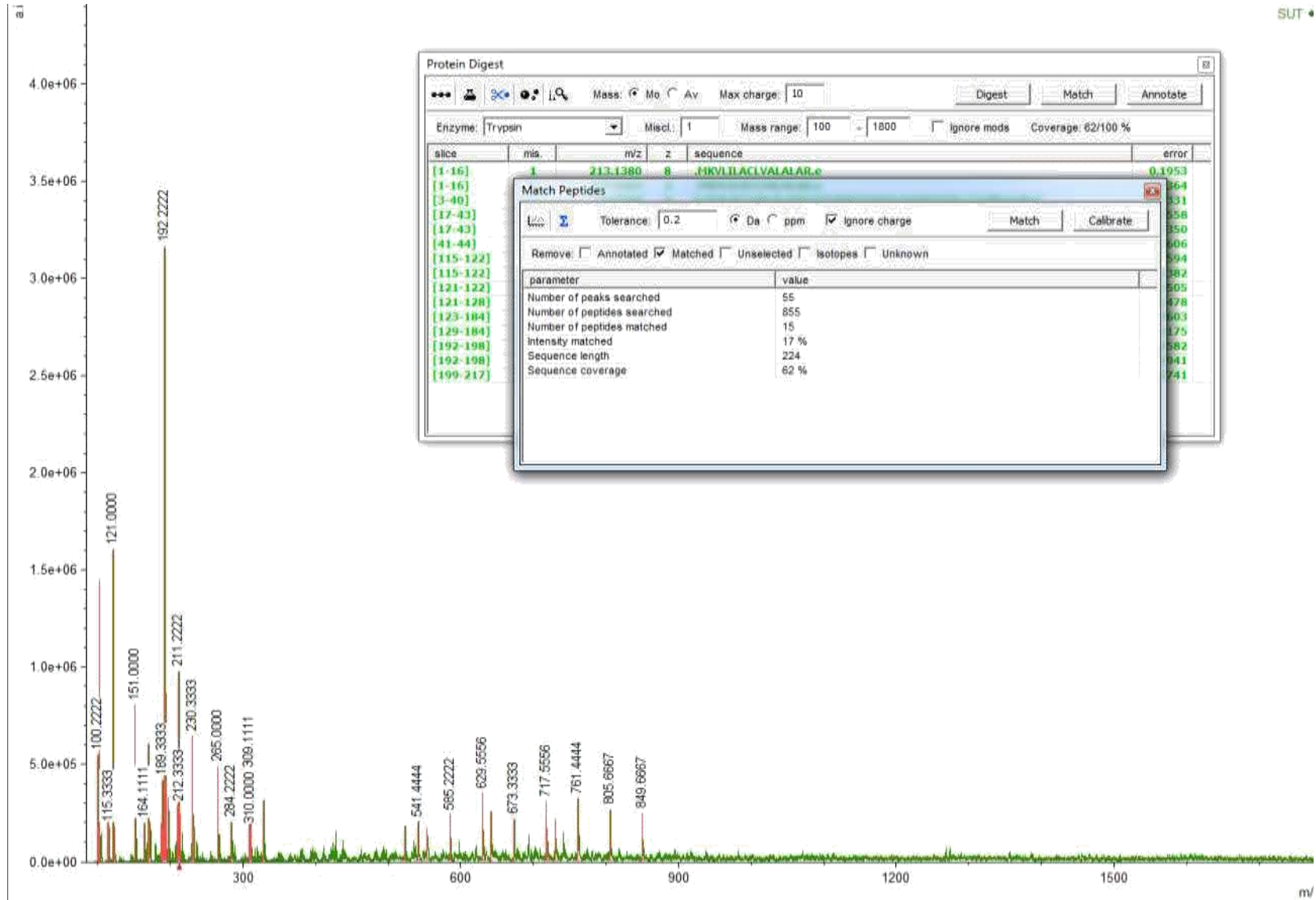
3J_betacasein_bsa #23 RT: 0.63 AV: 1 NL: 1.60E7
T: +p ESI Q1MS [100.000-1800.000]



Sekil 25. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu Sol-Jel) kullanılarak zenginleştirilen β-kazein/BSA peptit karışımının ESI Kütle Spektrumu.



Şekil 26. C₆H₆MgO₇-H₃PO₄-PEG@TEOS (3J kodlu sol-jel) için β-Kazein ve BSA Zenginleştirme Kütle Yüzdesi.



Şekil 27. Süt numunesi için $C_6H_6MgO_7-H_3PO_4@TEOS$ (3B kodlu sol-jel) için Eşleşme Yüzdesi.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Esin YILMAZ
Doğum Yeri : Eskişehir
Medeni Hali : Bekar
E-Posta : esylnmz@gmail.com
Adresi : Toki Yapracık Evleri 4449 Cadde CK-1 Blok D:52
Etimesgut / ANKARA

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği (İngilizce)

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce (YÖKDİL 75)- 2018 Mayıs

Japonca (Başlangıç)

İş Deneyimi

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi- Burdur (2006-2008)

Hacettepe Üniversitesi- Ankara (2008 –Halen)

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 02/07/2018

Tez Başlığı / Konusu: Kütle Spektrometrisi Uygulamalarında Fosfopeptitlerin Hassas Tayini İçin Yeni Stratejilerin Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 123 sayfalık kısmına ilişkin, 07/06/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç/-dahil
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

02.07.2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: ESİN YILMAZ

Öğrenci No: 114329202

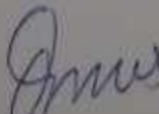
Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK

Programı:

Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Doç. Dr. Ömür Gökçelik
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

