

Proton Kopartılmış Peptit Türevlerinin Gaz Fazı Reaksiyon Mekanizmalarının Kütle Spektrometre İle İncelenmesi

Program Kodu: 1001

Proje No: 112T558

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. TALAT YALÇIN

Araştırmacı(lar):

Yrd. Doç. Dr. Alper ARSLANOĞLU

Bursiyerler:

Melike DİNÇ

Özge GÖRGÜN

Melda Zeynep GÜRAY

OCAK 2015
İZMİR

ÖNSÖZ

TÜBİTAK tarafından 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında desteklenen 112T558 nolu bu projede, proton kopartılmış (negatif iyon) peptit türevlerinin gaz-fazı reaksiyon mekanizmaları kütle spektrometresi (MS) ile detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Bu amaçla, bir veya birden fazla glutamik asit (E) veya aspartik asit (D) içeren model peptitlerin $[M-H]^-$ iyonlarının gaz-fazı parçalanma mekanizmaları detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Ayrıca, post-translasyonal bir modifikasyon olan fosforlanmanın peptit $[M-H]^-$ iyonların parçalanmasına olan etkisi de detaylandırılmıştır.

Proje ekibi TÜBİTAK'a maddi katkılarından dolayı teşekkür eder.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	1
ŞEKİL LİSTESİ.....	5
TABLO LİSTESİ.....	7
ÖZET.....	8
ABSTRACT.....	10
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	11
1.1. Kütle Spektrometresi ile Peptitlerin Sekanslarının Bulunması.....	11
1.2. Literatür Özeti.....	14
1.3. Projenin Amacı.....	16
BÖLÜM 2. DENEYSEL YÖNTEM.....	17
BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	19
3.1. AAAAAA ve Bir Adet Glutamik Asit İçeren Model Peptitlerin Negatif İyonlarının Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	19
3.1.1 EAAAAAA-OH ve EAAAAAA-NH ₂ Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	19
3.1.2 AAEEAAA-OH ve AAEEAAA-NH ₂ Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	20
3.1.3 AAAAAAE-OH ve AAAAAAE-NH ₂ Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	21
3.1.4 AEAAAAA-OH/NH ₂ , AAEEAAA-OH/NH ₂ , AAEEAAA-OH/NH ₂ ve AAAAAEA-OH/NH ₂ Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	23
3.2. YAGFLV ve Glutamik Asit veya Aspartik Asit İçeren Model Peptitlerin Negatif İyonlarının Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	26
3.2.1 EYAGFLV-OH ve DYAGFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	26
3.2.2 YEAGFLV-OH ve YDAGFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	27
3.2.3 YAEGFVL-OH ve YADGFVL-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	28
3.2.4 YAGEFLV-OH ve YAGDFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	29
3.2.5 YAGFELV-OH ve YAGFDLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	30

3.2.6 YAGFLEV-OH ve YAGFLDV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	31
3.2.7 YAGFLVE-OH ve YAGFLVD-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	32
3.3. YAGFLV ve Birden Fazla Glutamik Asit veya Aspartik Asit İçeren Model	
Peptitlerin Negatif İyonlarının Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	33
3.3.1 EYAGFLV-OH ve DDYAGFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	33
3.3.2 YEEAGFLV-OH ve YDDAGFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	36
3.3.3 YAEEGFVL-OH ve YADDGFVL-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	37
3.3.4 YAGEEFLV-OH ve YAGDDFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	38
3.3.5 YAGFEELV-OH ve YAGFDDLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	38
3.3.6 YAGFLEEV-OH ve YAGFLDDV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	39
3.3.7 YAGFLVEE-OH ve YAGFLVDD-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	40
3.3.8 EEEYAGFLV-OH ve DDDYAGFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	41
3.3.9 YEEEAGFLV-OH ve YDDDAGFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	42
3.3.10 YAEEEGFVL-OH ve YADDDGFVL-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	43
3.3.11 YAGEEEFLV-OH ve YAGDDDFLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	44
3.3.12 YAGFEEELV-OH ve YAGFDDDLV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	45
3.3.13 YAGFLEEEV-OH ve YAGFLDDDV-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	46
3.3.14 YAGFLVEEE-OH ve YAGFLVDDD-OH Peptitlerinin [M-H] ⁻ İyonu	
Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	47
3.3.15 Peptit C-ucunda Dörtlü ya da Beşli Asidik Amino Asit İçeren Model	
Peptitlerin [M-H] ⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	48

3.4. Fosforlanmış Amino Asit İçeren Peptitlerin Negatif İyonlarının Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	53
BÖLÜM 4. SONUÇLAR.....	63
BÖLÜM 5. KAYNAKLAR.....	67

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Peptitlerin parçalanma ürünlerinin adlandırılması.....	12
Şekil 2. Proton kopartılmış <i>b</i> iyonunun yapısı.....	14
Şekil 3. a) AAAAE, b) AAAAEE ve c) AAAEEE peptit türevlerinin negatif iyon kütle spektrumu.....	15
Şekil 4. Proton kopartılmış AAAAE peptit türevinden glutamik asit kopma mekanizması.....	15
Şekil 5. EAAAAAA-OH ve EAAAAAA-NH ₂ model peptitlerine ait [M-H] ⁻ iyonlarına ait kütle spektrumlarının karşılaştırılması.....	20
Şekil 6. AAAEAAA-OH ve AAAEAAA-NH ₂ model peptitlerine ait [M-H] ⁻ iyonlarına ait kütle spektrumlarının karşılaştırılması.....	21
Şekil 7. AAAAAAE-OH ve AAAAAAE-NH ₂ model peptitlerine ait [M-H] ⁻ iyonlarına ait kütle spektrumlarının karşılaştırılması.....	22
Şekil 8. EYAGFLV-OH ve DYAGFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları...	27
Şekil 9. YEAGFLV-OH ve YDAGFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları...	28
Şekil 10. YAEGFVL-OH ve YADGFVL-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	29
Şekil 11. YAGEFLV-OH ve YAGDFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	30
Şekil 12. YAGFELV-OH ve YAGFDLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	31
Şekil 13. YAGFLEV-OH ve YAGFLDV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	32
Şekil 14. YAGFLVE-OH ve YAGFLVD-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	33
Şekil 15. EEYAGFLV-OH ve DDYAGFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	34
Şekil 16. EEYAGFLV-OH peptiti [M-H] ⁻ iyonundan su kopma mekanizması spektrumları..	35
Şekil 17. YEEAGFLV-OH ve YDDAGFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	36
Şekil 18. YAEEGFVL-OH ve YADDGFVL-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	37
Şekil 19. YAGEEFLV-OH ve YAGDDFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	38
Şekil 20. YAGFEELV-OH ve YAGFDDLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	39

Şekil 21. YAGFLEE-V-OH ve YAGFLDDV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	40
Şekil 22. YAGFLVEE-OH ve YAGFLVDD-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	41
Şekil 23. EEEYAGFLV-OH ve DDDYAGFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	42
Şekil 24. YEEEAGFLV-OH ve YDDDAGFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	43
Şekil 25. YAEEEGFVL-OH ve YADDDGFVL-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	44
Şekil 26. YAGEEEEFLV-OH ve YAGDDDFLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	45
Şekil 27. YAGFEEELV-OH ve YAGFDDDLV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	46
Şekil 28. YAGFLEEEV-OH ve YAGFLDDD-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	47
Şekil 29. YAGFLVEEE-OH ve YAGFLVDDD-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	48
Şekil 30. YAGFLVEEEE-OH ve YAGFLVEEEEE-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	49
Şekil 31. Ardaşık glutamik asit elenme mekanizması	50
Şekil 32. Ardaşık ikinci glutamik asit elenme mekanizması	51
Şekil 33. Ardaşık üçüncü glutamik asit elenme mekanizması	52
Şekil 34. YAGFLVDDDD-OH ve YAGFLVDDDD-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumları.....	53
Şekil 35. Fosforlanmış serin, treonin ve tirozin amino asitleri.....	54
Şekil 36. Fosforik asit kopma mekanizması.....	55
Şekil 37. AEKEpYTV-D-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumu.....	56
Şekil 38. IETDKEpYT-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumu.....	57
Şekil 39. SKDESİpYV-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumu.....	58
Şekil 40. DMTpSGLPL-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumu.....	59
Şekil 41. KELLPLpSA-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumu.....	60
Şekil 42. YDMTTpSLP-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumu.....	61
Şekil 43. YDMpTGLPL-OH peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonu MS/MS spektrumu.....	62

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. AAAAAA veya YAGFLV peptit serisi ve birer adet glutamik asit veya aspartik asit içeren model peptitler	17
Tablo 2. YAGFLV ve ardışık glutamik asit veya aspartik asit içeren model peptitler	17
Tablo 3. Fosforlanmış amino asit içeren model peptitler	17
Tablo 4. AEAAAAA-OH ve AEAAAAA-NH ₂ model peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonlarının CID kütle spektrumlarında görülen parçalanma ürünleri ve iyon şiddetleri.....	23
Tablo 5. AAEAAAAA-OH ve AAEAAAAA-NH ₂ model peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonlarının CID kütle spektrumlarında görülen parçalanma ürünleri ve iyon şiddetleri.....	24
Tablo 6. AAAAEAA-OH ve AAAAEAA-NH ₂ model peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonlarının CID kütle spektrumlarında görülen parçalanma ürünleri ve iyon şiddetleri.....	24
Tablo 7. AAAAAEA-OH ve AAAAAEA-NH ₂ model peptitlerinin [M-H] ⁻ iyonlarının CID kütle spektrumlarında görülen parçalanma ürünleri ve iyon şiddetleri.....	25

ÖZET

PROTON KOPARTILMIŞ PEPTİT TÜREVLERİNİN GAZ FAZI REAKSİYON MEKANİZMALARININ KÜTLE SPEKTROMETRE İLE İNCELENMESİ

Proteinler canlı organizmalardaki yaşamsal faaliyetleri etkileyen ve düzenleyen en önemli yapı taşlarındandır. Hastalıklarda, kalp krizinde, stres altında v.b., hücrelerdeki protein seviyelerinde ve çeşitliliğinde değişimler gözlemlenmektedir. Bu tür proteinlerin fonksiyonlarını anlayabilmek için protein sekanslarının doğru tanımlanması çok önemlidir. Özellikle hücre içi sinyal iletimi fosforlanmış proteinler vasıtasıyla yapılmaktadır ve fosforlanmış proteinlerdeki fosfor grubunun hangi pozisyondaki (serin, S, tirozin, Y, veya tironin, T) amino asite bağlandığını belirleme ve sekansın doğru yapılması, proteinin fonksiyonunu anlamak açısından önemli gerekliliktir. Günümüzde proteinlerin enzimlerle kesilmesi ile elde edilen peptitlerden elde edilen gaz fazı Kütle Spektrometre sinyalleri (pozitif ve/veya negatif iyonlar) yardımı ile peptitlerin sekanslarını ve dolayısıyla proteinlerin amino asit dizilimleri tanımlanmaya çalışılmaktadır ve doğru tanımlayabilmek açısından gaz fazı parçalanma mekanizmalarının çok detaylı çalışılması, yeni informatik bilgiler elde etme açısından önemlidir.

Bu çalışmada, proton kopartılmış peptit türevlerinin gaz fazı reaksiyon mekanizmaları kütle spektrometre yardımı ile çalışılmıştır. Çalışmalar sırasında XAAAAAA-OH, AXAAAAA-OH, AAXAAAA-OH, AAAAXAA-OH, AAAAAAXA-OH, AAAAAAX-OH, XAAAAAA-NH₂, AXAAAAA-NH₂, AAXAAAA-NH₂, AAAAXAA-NH₂, AAAAAAXA-NH₂, AAAAAAX-NH₂ ve XYAGFLV-OH, YXAGFLV-OH, YAXGFLV-OH, YAGXFLV-OH, YAGFXLV-OH, YAGFLXV-OH ve YAGFLVX-OH (X=Glutamik Asit, E, veya Aspartik Asit D) peptit serileri, sekanslarında tekli asidik amino asit içeren peptitlerle, sistematik çalışmalar yapılmıştır. Amino asidin pozisyona bağlı gaz fazı parçalanma mekanizması ve ayrıca komşu amino asitlerin yan zincirlerinin gaz fazı parçalanmasına etkileri de incelenmiştir.

Ayrıca, sekanslarında birden fazla asidik amino asit içeren peptit türevleriyle de sistematik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar içinde, XXYAGFLV-OH, YXXAGFLV-OH, YAXXGFLV-OH, YAGXXFLV-OH, YAGFXLV-OH, YAGFLXXV-OH, YAGFLVXX-OH, (X=Glutamik Asit, E, veya Aspartik Asit D) VE XXXYAGFLV-OH, YXXXAGFLV-OH, YAXXXGFLV-OH, YAGXXXFLV-OH, YAGFXXXLV-OH, YAGFLXXXV-OH, YAGFLVXXXOH, (X=Glutamik Asit, E, veya Aspartik Asit D) peptit türevleri kullanılmıştır. Burada da birden fazla asidik amino asit içeren peptit türevlerinin pozisyon etkisi ve komşu aminoasitlerin yan zincirlerinin gaz fazı parçalanma mekanizmasına etkileri detaylandırılmıştır.

Bunlara ek olarak, YAGFLVEEEE-OH ve YAGFLVEEEEE-OH peptit türevleriyle çalışılmalar yapılmıştır ve etkileri detaylandırılmıştır. Ayrıca sekanslarında serine, S, tirozine, Y, treonin, T, bulunduran peptit türevleri ile de fosforlanmış peptitlerin gaz fazı parçalanma

mekanizmaları çalışılmıştır. Bu çalışma için, AEKEpYTVD-OH, IETDKEpYT-OH, SKDESlpYV-OH, DMTpSGLPL-OH, KELLPLpSA-OH, YDMTTpSLP-OH, ve YDMpTGLPL-OH fosforlanmış peptit türevleri kullanılmıştır.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GAS PHASE REACTION MECHANISM OF DE-PROTONATED PEPTIDE DERIVATIVES USING MASS SPECTROMETRY

Proteins are the most important building blocks that effect and organize all the living activity in the living organism. Certain illnesses or under certain stress etc., number of proteins and the level of proteins can be changed. In order to understand the function of the these proteins, their sequence can be obtained very accurately. Especially, the phosphorolyted proteins organize the signaling process in the cell and the sequence of phosphorolyted proteins and the prediction of the position of phosphoralyted group on the peptide (such as, serine, S, tyrosine, Y, or theronine, T) is very important. Nowadays, amino acids sequences of proteins can be obtained with mass spectrometry. After enzymatic cleavage of the proteins, small peptides can be obtained and these peptides can be used for the sequece of proteins. Mass Spectrometry signal either in positive or negative mode can be used to obtain sequence of the peptides. For this reason, gas phase reaction mechanism of peptides should be studied in detail to obtained new information about peptides fragmentation mechanism.

In this studies, AAXAAAA-OH, AAAAXAA-OH, AAAAXA-OH, AAAAAAX-OH, XAAAAAA-NH₂, AXAAAAA-NH₂, AAXAAAA-NH₂, AAAAXAA-NH₂, AAAAXA-NH₂, AAAAAAX-NH₂ ve XYAGFLV-OH, YXAGFLV-OH, YAXGFLV-OH, YAGXFLV-OH, YAGFXLV-OH, YAGFLXV-OH ve YAGFLVX-OH (X=Glutamic Acid, E, veya Aspartic Acid, D) peptides series which contains single acidic amino acids, have been used for sistematic studies. Position effect of the acidic residues and neighbour effect on the fragmentation reaction mechanism were also studied with these peptide series.

In addition, peptides containing more than one acidic residue were also studied. In these studies, XXYAGFLV-OH, YXXAGFLV-OH, YAXXGFLV-OH, YAGXXFLV-OH, YAGFXXLV-OH, YAGFLXXV-OH, YAGFLVXX-OH, (X=Glutamik Asit, E, veya Aspartik Asi D) VE XXXYAGFLV-OH, YXXXAGFLV-OH, YAXXXGFLV-OH, YAGXXXFLV-OH, YAGFXXXLV-OH, YAGFLXXXV-OH, YAGFLVXXXOH, (X=Glutamik Asit, E, veya Aspartik Asi D) were used. Again, the position and neighbour effect on the gas pase fragmentation reaction mechanism was studied. In addition, YAGFLVEEEE-OH ve YAGFLVEEEEE-OH peptide derivatives were also studied in detail. The peptide derivatives containing serine,S, tyrosine, Y, and threonine, T, in their amino acid sequence, the gas phase fragmentation reaction mechanism of phosphoralyted peptides were studied. In these studies, the phosphoralyted peptide derivatives, AEKEpYTV-D-OH, IETDKEpYT-OH, SKDESpYV-OH, DMTpSGLPL-OH, KELLPLpSA-OH, YDMTTpSLP-OH, and YDMpTGLPL-OH were used.

1. BÖLÜM

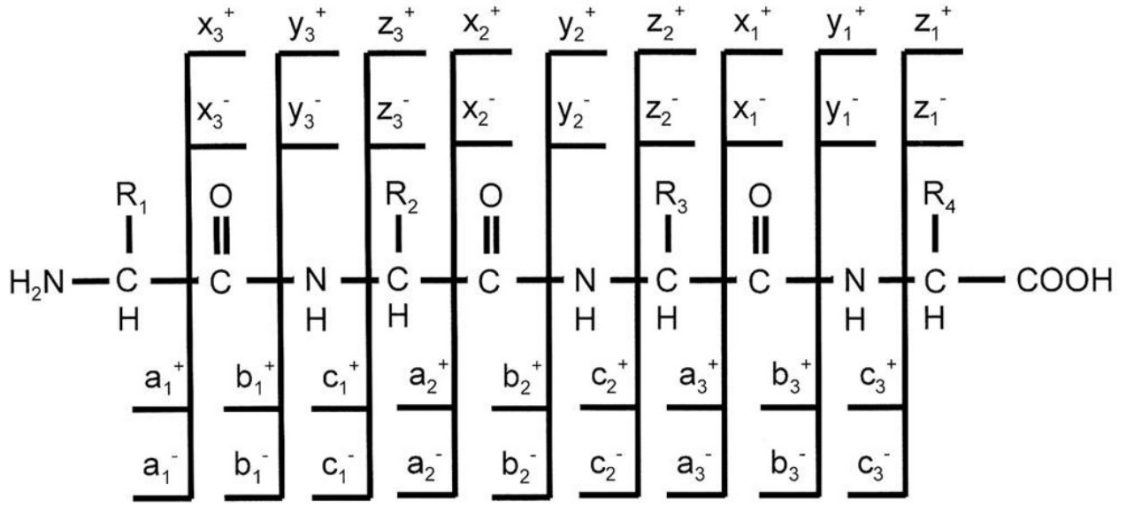
GİRİŞ

1.1 Kütle Spektrometresi ile Peptitlerin Sekanslarının Bulunması

Proteinler hücre içindeki faaliyetleri düzenleyen ve kontrol eden biyolojik makromoleküllerdir. Yirmi farklı doğal amino asit değişik şekillerde yan yan gelmeleri ile oluşurlar. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının bulunmasında ve amino asit dizilimlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kütle spektrometresi (MS) kullanılmaktadır. Son yirmi yılda, özellikle biyolojik örneklerin analizinde kütle spektrometresi yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Yates vd., 1993; Mann vd., 1993). Özellikle, 1989 yılında yumuşak iyonlaştırma teknikleri sayesinde (elektropüskürtmeyle iyonlaştırma, ESI ve matriks-yardımlı lazer desorpsiyon iyonlaştırma, MALDI) biyolojik makromoleküller parçalanmadan gaz fazına geçirilmesi mümkün olmuştur (Tanaka vd., 1988; Fenn vd., 1989). Bu tekniklerden, ESI John Fenn ve arkadaşları ve MALDI ise Kocihi Tanaka ve arkadaşları tarafından literatüre kazandırılmıştır ve 2002 yılında bu bilim insanları kimya dalında Nobel ödülü almışlardır.

1990 yılından itibaren kütle spektrometre sistemleri inanılmaz bir hızla gelişmiş ve her geçen gün kullanım ve uygulama alanları da gelişmiştir. Çok hassas olmaları, kısa sürede istenilen bilgiye ulaşılabilişmesi ve kullanım kolaylığı günümüzde bu sistemleri rakipsiz kılmaktadır. Analitik, çevre, tıbbi, biyolojik, forensik, doping vb. gibi alanlarda kullanılmakta olan bu sistemler, her geçen gün daha da gelişmektedir.

Özellikle proteomik biliminin temelini oluşturan amino asit dizilimlerinin doğru ve güvenilir bir şekilde bulunması ardışık kütle spektrometresi (MS/MS) ile mümkündür (McLuckey, 1992). Parçalanmak istenilen peptit iyonu, birinci analizör yardımı ile seçilmekte ve çarpışma gazı ile (He, N₂, Ar vb) parçalanması sağlanmaktadır. Parçalanma sonucu oluşan iyonların kütle sinyalleri, ikinci analizör yardımı ile ayrıştırılarak detektöre gönderilmekte ve MS/MS kütle spektrumu gözlenmektedir. Bu tekniğe çarpışmayla-indüklenmiş ayrışma (CID) denmektedir (McLuckey, 1992). Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu protonlanmış peptit iyonlarının gaz-fazı yapıları ve parçalanma mekanizmalarını aydınlatmaya yöneliktir. Parçalanma sırasında proton eğer peptitin N-ucu tarafında kalırsa oluşan iyonlara *a*-, *b*- ve *c* iyonları; diğer yandan proton eğer C-ucu tarafında kalırsa *x*-, *y*- ve *z* iyonları olarak adlandırılır ve bu parçalanma Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu isimlendirme Roepstorff and Fohlman (1984) tarafından literatüre kazandırılmış ve daha sonra Biemann (1988) tarafından modifiye edilmiştir. Protonu kopartılmış peptit iyonlarından elde edilen parçalanma ürünlerinin adlandırılması Şekil 1'deki gibidir, ancak protonlanmış iyonlarının kütlelerinden 2 Da (Dalton) eksiktir.



Şekil 1. Peptitlerin parçalanma ürünlerinin adlandırılması

Düşük enerjili CID sırasında oluşan iyonlar *b*, *a* ve *y* iyonlarıdır. Bu iyonların gaz-fazındaki yapılarının aydınlatılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır ve çalışmalar halen devam etmektedir (Mueller vd., 1988; Cordero vd., 1993; Yalcin vd., 1995, 1996; Ambihapathy vd., 1997; Paizs vd., 1999; Polce vd., 2000; Paizs ve Suhai, 2005; Harrison vd., 2006; Bleiholder vd., 2008; Harrison, 2009; Bythell vd., 2010). 1995 ve 1996 yılında *b* iyon türünün gaz-fazında beş halkalı bir yapıya sahip olduğu protonlanmış peptit türevleri ile yapılan çalışmalarda, gösterilmiştir ve bu yapı okzolon olarak adlandırılmıştır ve literatürde kabul görmüştür (Yalcin vd., 1995, 1996).

Diğer yandan, proton kopartılmış (negatif iyon, [M-H]⁻) peptit türevleri ile yapılmış çok fazla çalışma literatürde bulunmamaktadır. Negatif iyon modunda elde edilen sinyal seviyesi pozitif modda elde edilen sinyal seviyesinde oldukça düşüktür. Negatif iyon modundaki çalışmalarda analiz edilmek istenen peptit türevlerinden bir proton kopartılması çok kolay olamamaktadır ve sekanlarında asidik amino asit ihtiva eden veya kolaylıkla kararlı negatif iyonlar oluşturabilecek peptit türevleri ile çalışılmaktadır. Özellikle post-translasyonel modifikasyona uğramış proteinler (fosforlanma veya sülfatlanma) ve peptitler içerdikleri bu gruplardan dolayı gaz-fazında çok kolaylıkla negatif iyon oluşturabilmekte ve negatif iyon modunda ardışık kütle spektrometresi ile analizleri yapılabilmektedir.

Proteinlerin hücre içerisindeki fonksiyonlarını belirleyen bu modifikasyonların hangi amino asit üzerinde olduğu ve hangi sayıda modifikasyona uğradığını tanımlamak bu konuda çalışan bilim insanları için çok önemlidir. Bu konuda yeterli ve doğru bilgiyi veren sadece ardışık kütle spektrometresidir. 2006 yılında yapmış olduğumuz bir çalışmada proton kopartılmış peptit türevlerinin C-ucu tarafında bulunan glutamik asidin (E) ardışık bir şekilde

kopma mekanizması tarafımızdan gösterilmiştir (Li vd., 2006). Negatif iyon modunda yapılan bu çalışma ile hem bünyesinde glutamik asit bulunduran peptit türevleri tanımlanabilmekte ve hem de peptitlerin C-ucu pozisyonunda bulunan toplam glutamik asit sayısı belirlenebilmektedir. Bu sayede amino asit dizilimi bilinmeyen peptitlerin sekans tanımlanmasında yardımcı olacak bilgiler elde edilebilmektedir.

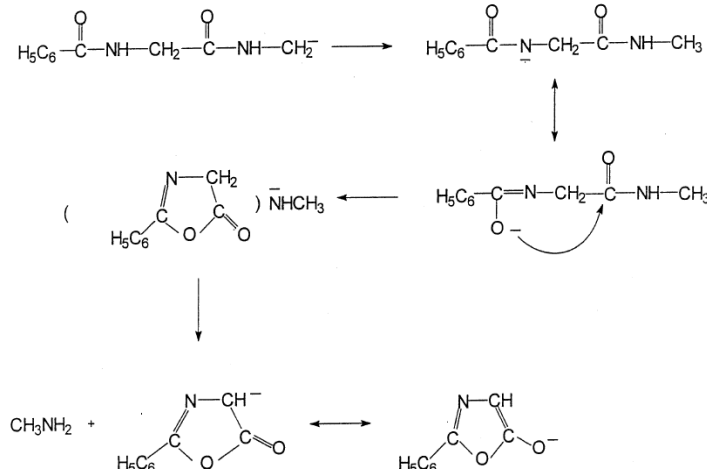
Protonu kopartılmış peptit türevlerinin gaz-fazı parçalanma mekanizmalarının detaylandırılarak çalışılması önemlidir ve pozitif mod çalışmaları ile birleştirildiğinde çok daha detaylı bilgiler verebilmektedir. Bu sayede bünyesinde çok sayıda asidik amino asiti grubu bulunduran veya değişik modifikasyonlara uğramış bilinmeyen proteinlerin amino asit dizilimlerinin daha doğru tanımlanabilmesine olanak sağlanacaktır. Bilinmeyen proteinlerin amino asit dizilimlerinin bulunmasında yanlışlıklar olabilmesi muhtemeldir. Özellikle hücre içerisindeki fonksiyonları araştırılan fosforlanmış proteinlerin modifiye olan bölgelerinin bulunması ve hangi sayıda modifiye olduğu, günümüzde, sadece ardaşık kütle spektrometrisi ile mümkün olabilmektedir.

Bu proje kapsamında bünyesinde değişik sayıda glutamik asit (E) veya aspartik asit (D) içeren model peptitlerin $[M-H]^-$ iyonlarının gaz-fazı parçalanma mekanizmaları sistematik olarak çalışılmıştır. Bu model peptitlere ek olarak fosforlanmış serin (S), tironin (T) veya tirozin (Y) içeren peptitlerinde negatif iyon çalışması eklenmiştir.

1.2 Literatür Özeti

Bilindiği üzere proteinler yirmi temel aminoasitten oluşmaktadır. Bu aminoasitler kendi aralarında asidik, bazik, polar ya da apolar olarak sınıflandırılmışlardır. Kütle spektrometresi, peptitlerin ve proteinlerin sekanslarının doğru bir şekilde bulunmasına yardımcı olan önemli bir araçtır ve son yıllarda proteomik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Aebersold ve Goodlett, 2001). Protonlanmış peptit türevlerinin gaz-fazı parçalanma mekanizmaları bir çok grup tarafından detaylı bir şekilde çalışılmıştır (Paizs vd., 1999; Farrugia vd., 2001; Smith vd., 2006; Gonzales vd., 1996; Cox vd., 1996; Vachet vd., 1997; Wysocki vd., 2000; Tsapralis vd., 2000; Harrison, 2008). Bunun yanında protonu kopartılmış peptit türevleri ile ilgili çok fazla detaylı çalışma yapılmamıştır.

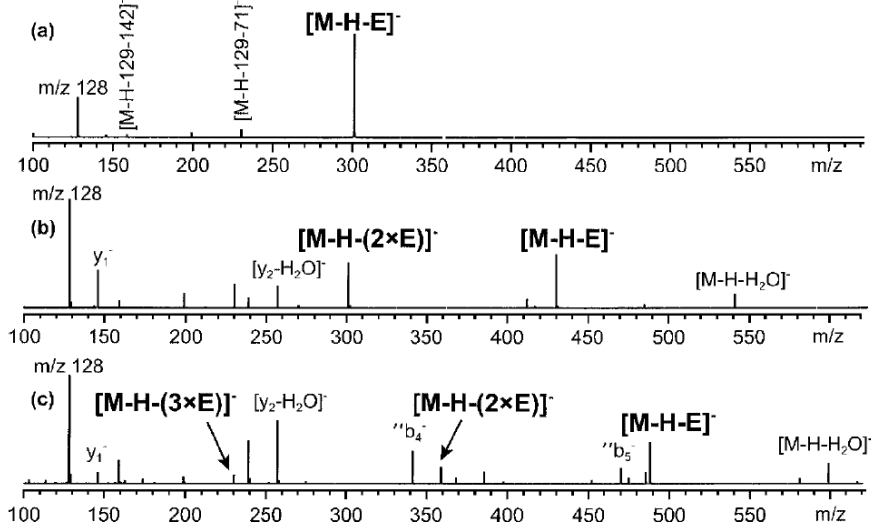
Protonu kopartılmış peptit türevlerinin gaz fazı parçalanma çalışmalarında çoğunlukla küçük peptit türevleri kullanılmıştır. Harison ve Young'un (2004) yaptıkları bir çalışmada protonu kopartılmış olan N-benzil peptit türevinin oluşturduğu *b* iyon türünün okzazon yapısında olduğunu rapor edilmiştir. Bu iyonun oluşum mekanizması Şekil 2'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere peptitin N-ucu pozisyonunda takılı olan benzil grubu bu mekanizmanın doğal peptit türevleri için ne derece uygulanabilir olduğu bu tür peptitlerin negatif iyon modunda oluşturacağı *b*-türü iyonlarında bu yapıda olup olmadığı hala net değildir ve bu konuda da literatürde herhangi bir çalışma yapılmamıştır.



Şekil 2. Proton kopartılmış *b* iyonunun yapısı

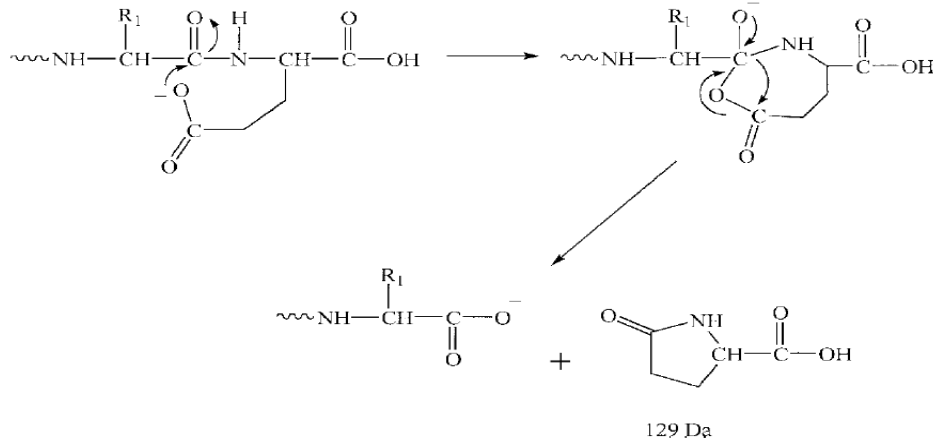
Harrison (2002) diğer bir çalışmasında ise protonu kopartılmış ve fenilalanin ihtiva eden ikili ve üçlü peptit türevlerinde fenilalanin etkisini araştırmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki; fenilalanin pozisyonuna göre parçalanma mekanizmalarının farklılıklar gösterdiğini

gözlemlemiştir. Beş ve altı amino asit grubu ihtiva eden protonu kopartılmış peptit türevleri ile yapmış olduğumuz çalışmalarda C-terminal pozisyonda bulunan glutamik asit grubunun ardışık olarak kopma özelliği gösterirken (Şekil 3) aynı özellik aspartik asit için gözlenmemiştir (Li vd., 2006).



Şekil 3. a) AAAAE, b) AAAAEE ve c) AAAEEE peptit türevlerinin negatif iyon kütle spektrumu

Bu kopmaların sebebi ise parçalanma sırasında glutamik asitin oluşturduğu kararlı yüksüz yapı olduğu düşünülebilir. Detaylı mekanizma Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Protonu kopartılmış AAAAE peptit türevinden glutamik asit kopma mekanizması

Şekil 3'de gösterildiği gibi ardışık glutamik mekanizması ikili ve üçlü glutamik asit ihtiva eden peptit türevleri içinde benzer olacaktır. Burada sorulması gereken etkisiz alanın

yerine diğerk amino asit grupları kullanıldığında bu mekanizmanın hala geçerli olup olmadığı ve ardışık glutamik asit kopmasının sınırının ne olacağı olmalıdır. Yan grubunda alkil ve hidrojen grubu ihtiva eden ve peptit uzunlukları 2 ile 5'li amino asitler içeren protonu kopartılmış peptit türevleri ile yapılan çalışmada genellikle c ve y türü iyon tipleri gözlenmiştir (Pu ve Cassady, 2008). Literatürde, protonu kopartılmış peptit türevleri ile yapılan çalışmalarda değişik grupların etkileri çalışılmıştır. Hidroksil grubu ihtiva eden (Pu ve Cassady, 2008) peptit türevleri ile yapılan gaz-fazı parçalanma mekanizması çalışmalarında c ve y türü iyonlarının olduğu rapor edilmiştir. Adı geçen çalışmada serin (S) ve tirionin (T)'den yan zincir grubu kopması gözlemlenirken aynı özellik tirozin (Y) için çok etkili gözlenmemiştir. Guo ve arkadaşları (2009) halkalı yapıya sahip protonu kopartılmış ikili peptit türevleri ile yaptığı çalışma peptitleri oluşturan amino asitlerin fonksiyonel gruplarının kopmalarını gözlemlemiştir ve bu bilgi kullanılarak peptit amino asit dizilimlerinin yapılabileceğini gösterilmiştir. Fakat görüldüğü üzere küçük çaplı peptit türevleri ile yapılan bu çalışma daha büyük çaplı peptit türevlerinde nasıl bir sonuç göstereceği açık değildir.

1.3 Projenin Amacı

Bu çalışmada protonu kopartılmış ve bir veya birden fazla asidik amino asit (glutamik asit veya aspartik asit) ihtiva eden model peptit türevlerinin negatif iyon modunda gaz-fazı parçalanma mekanizmaları çalışılmıştır. Bu peptit türevlerinin amino asiti dizilimlerinin doğru bir şekilde tayin edilebilmesi için parçalanma mekanizmaları araştırılmıştır ve elde edilen bilgiler detaylandırılmıştır. Ayrıca fosforlanmış model peptit türevlerinin gaz-fazı parçalanma mekanizmaları çalışılmıştır. Bu bilgiler altında bilinmeyen peptit veya proteinlerin sekansları ve modifiye edilmiş grupların yerleri hakkında daha sağlıklı bilgiler edinebilecektir.

2. BÖLÜM

DENEYSEL YÖNTEM

Deneyler sırasında kullanılan tüm model peptitler GL Biochem Ltd. (Şangay, Çin) firmasından temin edilmiştir ve herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan direk kullanılmıştır. Bu model peptitler aşağıdaki Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. AAAAAA veya YAGFLV ve birer tane glutamik asit veya aspartik asit içeren model peptitler

E AAAAAA-NH ₂	E AAAAAA-OH	E YAGFLV-OH	D YAGFLV-OH
A EAAAAA-NH ₂	A EAAAAA-OH	Y EAGFLV-OH	Y DAGFLV-OH
AA EAAAA-NH ₂	AA EAAAA-OH	YA EAGFVL-OH	YAD GFVL-OH
AAA EAAA-NH ₂	AAA EAAA-OH	YAG EFLV-OH	YAGD FLV-OH
AAAA EAA-NH ₂	AAAA EAA-OH	YAGF ELV-OH	YAGFD LV-OH
AAAAA EA-NH ₂	AAAAA EA-OH	YAGFL EV-OH	YAGFLD V-OH
AAAAAA E-NH ₂	AAAAAA E-OH	YAGFLV E-OH	YAGFLVD -OH

Tablo 2. YAGFLV ve ardışık glutamik asit veya aspartik asit içeren model peptitler

EE YAGFLV-OH	DD YAGFLV-OH	EEE YAGFLV-OH	DDD YAGFLV-OH
YEE AGFLV-OH	YDD AGFLV-OH	YEEE AGFLV-OH	YDDD AGFLV-OH
YAE EAGFVL-OH	YADD GFVL-OH	YAE EEAGFVL-OH	YADDD GFVL-OH
YAGE EFLV-OH	YAGDD FLV-OH	YAGE EEFLV-OH	YAGDDD FLV-OH
YAGFE ELV-OH	YAGFDD LV-OH	YAGFE EEELV-OH	YAGFDDDD LV-OH
YAGFL EEV-OH	YAGFLDD V-OH	YAGFL EEEEV-OH	YAGFLDDDD V-OH
YAGFLV EE-OH	YAGFLVDD -OH	YAGFLV EEEE-OH	YAGFLVDDDD -OH
		YAGFLV EEEEE-OH	YAGFLVDDDDD -OH
		YAGFLV EEEEEE-OH	YAGFLVDDDDDD -OH

Tablo 3. Fosforlanmış amino asit içeren model peptitler

AEKEp YTVD-OH	DMTp SGLPL-OH	IETDKEp YT-OH	KELLPLp SA-OH
SKDESip YV-OH	YDMTTp SLP-OH	YDMp TGLPL-OH	

Yaklaşık 2 mg tartılan peptitler hacimce 50:50 metanol ve ultra saf su içeren çözeltide çözülmüştür ve böylece yaklaşık 10⁻³ M peptit stok çözeltileri elde edilmiştir ve -20 °C'de saklanmıştır. Kütle spektrometresine direk enjekte edilen peptit konsantrasyonu ise 100 µM'dır ve bu çözelti hacimce 49:49:2 metanol:ultra saf su:amonyum hidroksit içeren çözeltide hazırlanmıştır.

MS/MS deneyleri için elektropüskürtme iyonlaştırmalı (ESI) LTQ XL lineer iyon tuzaklı kütle spektrometresi (Thermo Finnigan, San Jose, CA) negatif iyon modunda kullanılmıştır. Örneğin akış hızı dakikada 5 µL'dir ve peptitlere ait $[M-H]^-$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumları kaydedilmiştir. Deneylerden önce kafein, MRFA ve Ultramark 1621 (Calmix) ile cihazın kalibrasyonu yapılmıştır. Deneysel parametreler ise şu şekildedir: Püskürtme voltajı -4.0 kV, kapiler sıcaklık 300 °C, aktivasyon (q) 0.250, aktivasyon zamanı 30 ms, normalleşmiş çarpışma enerjisi 20-28 % ve kütle izolasyon aralığı (m/z) 1.2 ile 1.6. Kurutucu gaz olarak %99 saflıkta azot, çarpışma gazı olarak da yüksek saflıkta helyum gazı kullanılmıştır. Her bir spektrum için en az 400 taramanın ortalaması alınmıştır ve tüm veriler Thermo (Thermo Fisher Scientific) firmasının XCALIBUR™ (versiyon 2.0) yazılım data sistemi ile analiz edilmiştir.

3. BÖLÜM

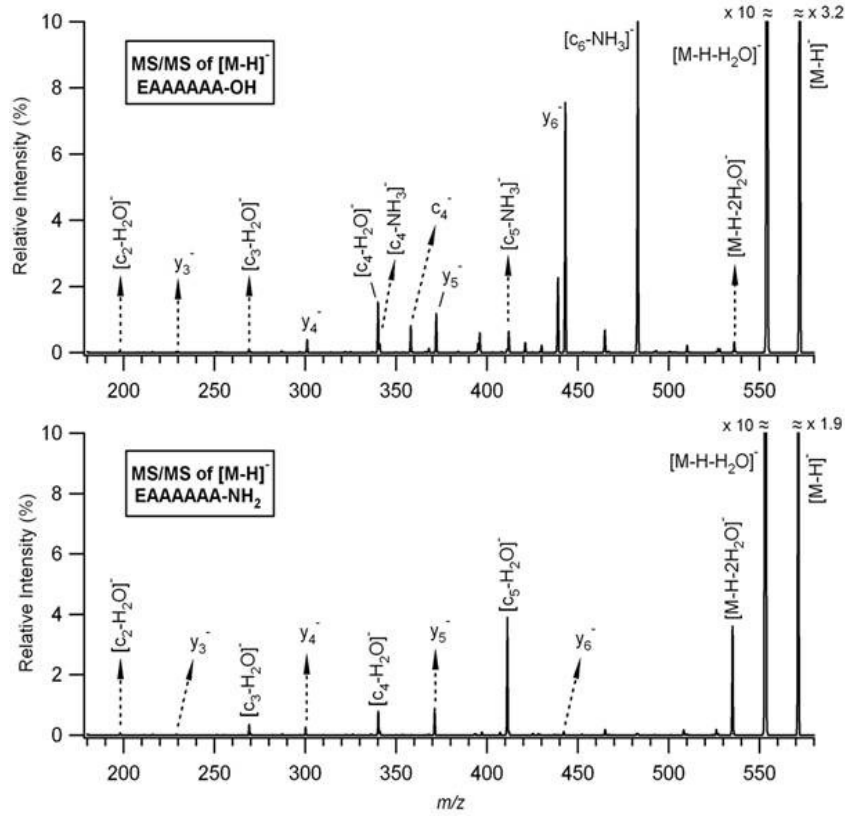
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. AAAAAA ve Bir Adet Glutamik Asit İçeren Model Peptitlerin Negatif İyonlarının Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

Glutamik asit yapısında hidroksil grubu barındıran doğal bir amino asittir ve bu özelliğinden dolayı gaz-fazında negatif iyon oluşturma potansiyeli vardır. Çalışmanın bu kısmında, glutamik asit (Glu, E) ihtiva eden model heptapeptitlerin negatif iyon (proton kopartılmış) kütle spektrumları gösterilmiştir. Bu çalışmada peptitlerdeki glutamik asit pozisyonunun [M-H]⁻ iyonunun parçalanma mekanizması üzerinde etkisi araştırılmıştır. Bunu aydınlatabilmek için EAAAAA-OH, AEAAAAA-OH, AAEAAAAA-OH, AAEEAAA-OH, AAAEEAA-OH, AAAAAEA-OH ve AAAAAAE-OH (A:alanin) model peptitlerinden faydalanılmıştır. Bu birinci set peptitlerde görüleceği üzere hem glutamik asitin yan zincirinde hem de peptitin C-ucunda hidroksil grubu bulunmaktadır. Bu durumda her iki taraftanda su kopması gözlemlenebilecektir. Hangi taraftan su koptuğunu aydınlatabilmek için, peptitlerin C-ucu tarafı amin grubu (-NH₂) ile modifiye edilmiştir ve sırasıyla EAAAAA-NH₂, AEAAAAA-NH₂, AAEAAAAA-NH₂, AAEEAAA-NH₂, AAAEEAA-NH₂ ve AAAAAEA-NH₂ model peptitleri ile deneyler yapılmıştır. Her iki setteki peptitler karşılaştırmalı olarak aşağıda rapor edilmiştir.

3.1.1 EAAAAA-OH ve EAAAAA-NH₂ Peptitlerinin [M-H]⁻ İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Şekil 5'te görüleceği üzere, EAAAAA-OH peptitinin [M-H]⁻ iyonunun kütlesi *m/z* 572, diğer yandan EAAAAA-NH₂ peptitinin ise *m/z* 571'dir. Bu iyonlar çarpışma ile indüklenmiş (CID) MS/MS ile gaz-fazında parçalanmaları sağlanmıştır ve oluşan parçalanma ürünleri spektrumlarda gösterilmiştir. Parçalanma sırasında en yüksek şiddette su kopması gözlemlenmiştir. [M-H]⁻ iyonundan ikinci su kopması da C-ucu amin içeren peptitte % 4 seviyesindedir. C-ucu serbest hidroksil grubu içeren peptitin analizinde [C₆-NH₃]⁻, [C₅-NH₃]⁻, ve [C₄-NH₃]⁻ iyonlarının varlığı tespit edilmiştir. Diğer peptitte ise bu iyonlara rastlanılmamıştır. Her iki peptitte y₆⁻, y₅⁻, y₄⁻ ve y₃⁻ iyonları mevcuttur, ancak bu iyonlar C-ucunda hidroksil ihtiva eden peptitte daha yüksek iyon şiddetine sahiptirler.



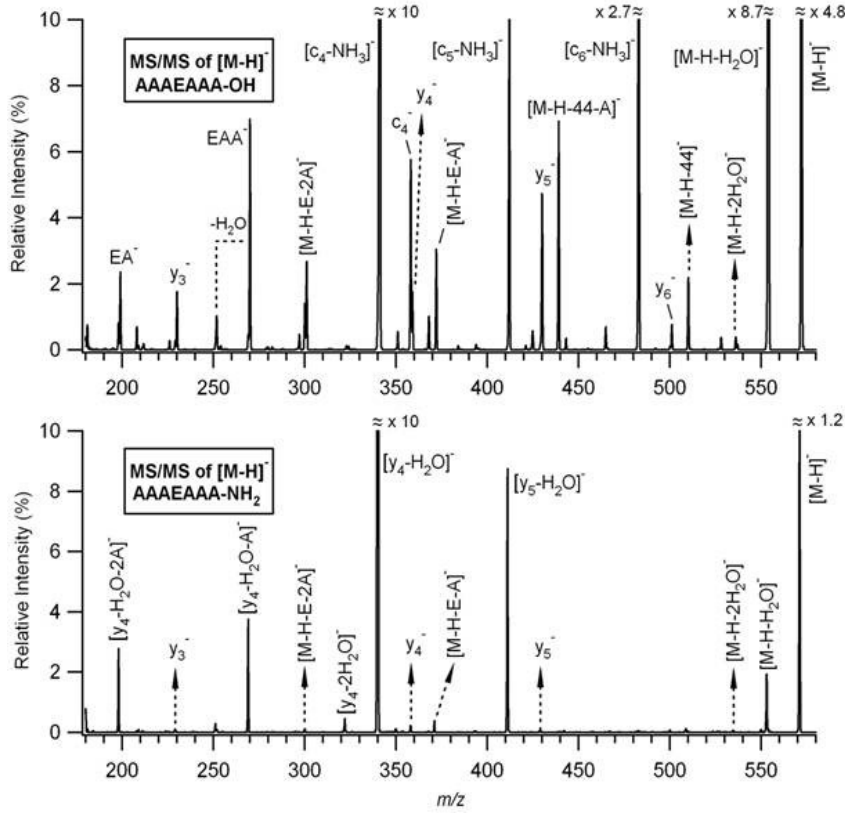
Şekil 5. EAAAAAA-OH ve EAAAAAA-NH₂ model peptitlerine ait [M-H]⁻ iyonlarına ait kütle spektrumlarının karşılaştırması

Bu iyonlara ek olarak, Şekil 5’de görüleceği üzere C-ucunda hidroksil grubu içeren peptitin spektrumunda c₄⁻ iyonu gözlemlenmiştir, fakat C-ucunda amin bulunduran peptitte ise bu iyon yoktur. Bir diğer farklılık ise C-ucunda amin içeren peptitte [c₅-H₂O]⁻ iyonunun varlığı ve C-ucunda hidroksil grubu içeren peptitte, diğerinden farklı olarak, [c₆-NH₃]⁻, ve y₆⁻ iyonları, kütle spektrumunda, en şiddetli sinyaller olarak gözlenirken, Her iki peptit türevinin kütle spektrumunda da [c₄-H₂O]⁻, [c₃-H₂O]⁻ ve [c₂-H₂O]⁻ iyonları varlığı saptanmıştır.

3.1.2 AAAEAAA-OH ve AAAEAAA-NH₂ Peptitlerinin [M-H]⁻ İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Bu model peptit serisinde ise glutamik asit baştan dördüncü pozisyona yerleştirilmiştir ve her iki tarafında nötr bir amino asit olan alaninden (Ala; A) üçer tane bulunmaktadır. C-ucunda hidroksil grubu içeren peptitte % 87 iyon şiddetinde su kopması ([M-H-H₂O])⁻ gözlemlenmiştir (Şekil 6). Fakat bu iyonun şiddeti C-ucu aminli peptitte % 2 seviyesindedir. Bu farklılık birinci bahsedilen peptitte iki tane potansiyel su kopacak yerin olmasından (hem glutamik asitin yan zinciri hemde peptitin C-ucu) kaynaklandığı düşünülmektedir.

AAAEAAA-OH peptidin $[M-H]^-$ iyonunun CID kütle spektrumunda y_6^- , y_5^- , y_4^- ve y_3^- iyonlarının varlığı gözlemlenmiştir. Diğer yandan C-ucu amin içeren peptitte ise bu iyonların iyon şiddetleri çok düşüktür.



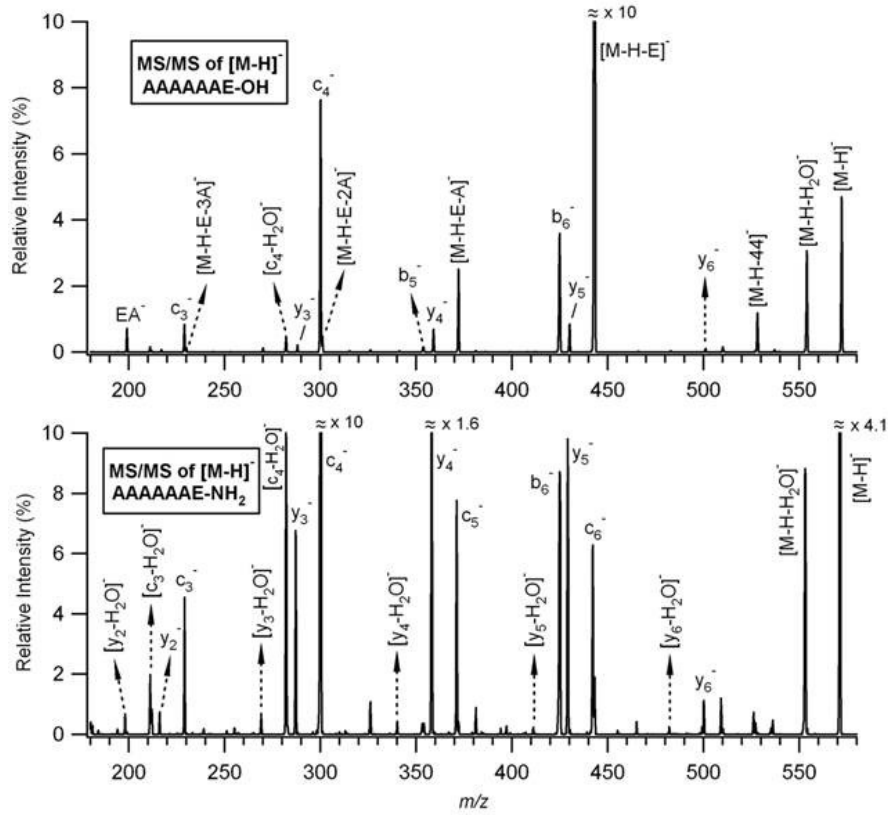
Şekil 6. AAAEAAA-OH ve AAAEAAA-NH₂ model peptitlerine ait $[M-H]^-$ iyonlarına ait kütle spektrumların karşılaştırması

C-ucu hidroksil grubu içeren peptidin $[M-H]^-$ iyonu CID kütle spektrumunda $[c_6-NH_3]^-$, $[c_5-NH_3]^-$, $[c_4-NH_3]^-$ iyonları saptanmıştır. Ek olarak EA^- ve EAA^- iyonları da gözlemlenmiştir. Fakat aynı iyonlar C-ucu amin içeren peptitte bulunmamaktadır.

3.1.3 AAAAAE-OH ve AAAAAE-NH₂ Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Bu model peptit serisinde ise glutamik asit son pozisyonudur ve bu pozisyonun CID kütle spektrumuna olan etkisi araştırılmıştır (Şekil 7). C-ucu hidroksil grubu içeren peptidin $[M-H]^-$ iyonunun kütle spektrumunda peptidin C-ucundaki amino asitin yani glutamik asitin, $[M-H-E]^-$ ve daha sonra sırasıyla alaninlerin koptuğu ($[M-H-A]^-$, $[M-H-2A]^-$, $[M-H-3A]^-$) gözlemlenmiştir. Bununla ilgili olan mekanizma daha önceleri Li, Yalcin & Cassidy tarafından

önerilmiştir ve Şekil 4'de gösterilmiştir. Bu çalışma daha önce bulunan sonuçları desteklemektedir. Bu iyonlar ile birlikte y_6^- , y_5^- , y_4^- ve y_3^- iyonlarına da düşük sinyal şiddetinde rastlanılmıştır. Ayrıca c_4^- ve c_3^- iyonları da kütle spektrumunda mevcuttur.



Şekil 7. AAAAAAE-OH ve AAAAAAE-NH₂ model peptitlerine ait [M-H]⁻ iyonlarına ait kütle spektrumların karşılaştırması

Diğer yandan C-ucunda amin içeren peptitte y_6^- , y_5^- , y_4^- , y_3^- ve y_2^- iyonları ve bu iyonlardan su kopmalar farklı iyon şiddetlerinde elde edilmiştir. c_6^- , c_5^- , c_4^- , ve c_3^- iyonları ve bu iyonlardan su kopmaları da çeşitli iyon şiddetlerinde gözlemlenmiştir. c_4^- iyonun spektrumdaki en yüksek şiddetteki iyonudur. C-ucu hidroksil içeren peptitte gözlemlenen peptit C-ucundaki glutamik asit kopması C-ucu amin içeren peptitte yoktur. Peptit C-ucundaki amino asit kopma mekanizmasının hidroksil grubu vasıtasıyla olduğunu ve önerilen mekanizmayı desteklemektedir (Şekil 4).

**3.1.4 AEAAAAA-OH/NH₂, AAEAAAA-OH/NH₂, AAAAEAA-OH/NH₂ ve
AAAAAEA-OH/NH₂ Peptitlerinin [M-H]⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma
Reaksiyonları**

Bu dört çift model peptitlerin [M-H]⁻ iyonu CID kütle spektrumdan elde edilen iyonlar incelenmiştir ve aşağıdaki Tablo 4-7'de sırasıyla iyonlar ve şiddetleri rapor edilmiştir. Tabloda iyon şiddetleri %30'un altında olan iyonlar için düşük (d), %30-60 arasındaki iyon şiddetine sahip olan iyonlar için orta (o) ve de iyon şiddeti %60'ın üstünde olan iyonlar içinse yüksek (y) harfi kullanılmıştır.

Tablo 4. AEAAAAA-OH ve AEAAAAA-NH₂ Model Peptitlerin [M-H]⁻ İyonlarının CID Kütle Spektrumlarında Görülen Parçalanma Ürünleri ve İyon Şiddetleri

AEAAAAA-OH							
	A, n=1	E, n=2	A, n=3	A, n=4	A, n=5	A, n=6	A, n=7
c _n ⁻				d	d		
[c _n -H ₂ O] ⁻		d	d	d		d	
[c _n -NH ₃] ⁻			d	d	d	d	
y _n ⁻			d	d	d	d	
[y _n -H ₂ O] ⁻							

AEAAAAA-NH ₂							
	A, n=1	E, n=2	A, n=3	A, n=4	A, n=5	A, n=6	A, n=7
c _n ⁻							
[c _n -H ₂ O] ⁻		d	d	o	y	d	
[c _n -NH ₃] ⁻							
y _n ⁻			d	d	d		
[y _n -H ₂ O] ⁻							

Tablo 5. AAEEAAA-OH ve AAEEAAA-NH₂ Model Peptitlerin [M-H]⁻ İyonlarının CID Kütle Spektrumlarında Görülen Parçalanma Ürünleri ve İyon Şiddetleri

AAEEAAA-OH							
	A, n=1	A, n=2	E, n=3	A, n=4	A, n=5	A, n=6	A, n=7
c_n^-			d	d			
$[c_n-H_2O]^-$			d				
$[c_n-NH_3]^-$			d	o	y		
y_n^-			d	d	d	d	
$[y_n-H_2O]^-$							

AAEEAAA-NH ₂							
	A, n=1	A, n=2	E, n=3	A, n=4	A, n=5	A, n=6	A, n=7
c_n^-							
$[c_n-H_2O]^-$			d	d	y	d	
$[c_n-NH_3]^-$							
y_n^-			d	d			
$[y_n-H_2O]^-$							

Tablo 6. AAAAEAA-OH ve AAAAEAA-NH₂ Model Peptitlerin [M-H]⁻ İyonlarının CID Kütle Spektrumlarında Görülen Parçalanma Ürünleri ve İyon Şiddetleri

AAAAEAA-OH							
	A, n=1	A, n=2	A, n=3	A, n=4	E, n=5	A, n=6	A, n=7
c_n^-			d	d	d	d	
$[c_n-H_2O]^-$							
$[c_n-NH_3]^-$					d	y	
y_n^-			d	d	d	d	
$[y_n-H_2O]^-$							

AAAAEAA-NH ₂							
	A, n=1	A, n=2	A, n=3	A, n=4	E, n=5	A, n=6	A, n=7
c_n^-			d	d	d		
$[c_n-H_2O]^-$					d		
$[c_n-NH_3]^-$							
y_n^-			d				
$[y_n-H_2O]^-$			y	d	d		

Tablo 7. AAAAAEA-OH ve AAAAAEA-NH₂ Model Peptitlerin [M-H]⁻ İyonlarının CID Kütle Spektrumlarında Görülen Parçalanma Ürünleri ve İyon Şiddetleri

AAAAAEA-OH							
	A, n=1	A, n=2	A, n=3	A, n=4	A, n=5	E, n=6	A, n=7
c_n^-			o	d		d	
$[c_n-H_2O]^-$							
$[c_n-NH_3]^-$							
y_n^-		d	d	d	d	d	
$[y_n-H_2O]^-$							
AAAAAEA-NH ₂							
	A, n=1	A, n=2	A, n=3	A, n=4	A, n=5	E, n=6	A, n=7
c_n^-			y	d	d		
$[c_n-H_2O]^-$			o	d		d	
$[c_n-NH_3]^-$					d		
y_n^-		d	d	d	d		
$[y_n-H_2O]^-$		d	d	d	d	d	

3.2. YAGFLV ve Glutamik Asit veya Aspartik Asit İçeren Model Peptitlerin Negatif İyonlarının Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

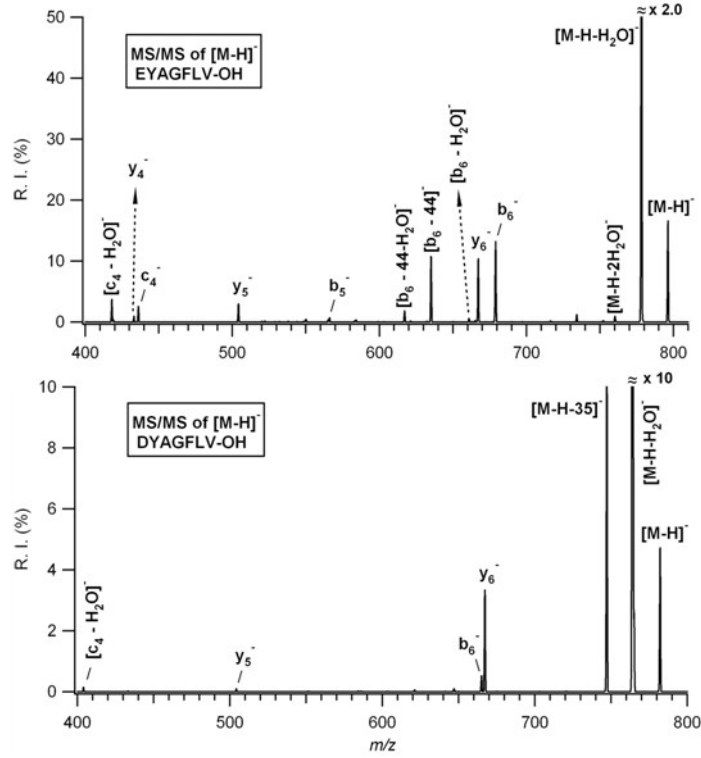
Alaninli peptit serileri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlardan sonra, Model heptapeptitlerin amino asit dizilimleri sırasıyla XYAGFLV-OH, YXAGFLV-OH, YAXGFVL-OH, YAGXFLV-OH, YAGFXLV-OH, YAGFLXV-OH ve YAGFLVX-OH olarak değiştirilmiştir. Glutamik asit (Glu, E) veya aspartik asit (Asp, D) içeren model peptitlerden izole edilen $[M-H]^-$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumları karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Dizilimdeki Y, A, G, F, L ve V harfleri sırasıyla trozin, alanin, glisin, fenilalanin, lösin ve valin amino asitlerini göstermektedir. Diğer yandan, X harfi ise asidik amino asit olan glutamik asit veya aspartik asiti belirtmektedir. Model peptitlerden anlaşılacağı üzere asidik amino asitin pozisyonu her peptitte yer değiştirmiştir ve peptitin N-ucundan C-ucuna doğru sırasıyla yer değiştirmiştir. Böylece hem asidik amino asitin çeşiti hem de peptit içindeki pozisyonu detaylı bir şekilde karşılaştırmalı çalışılmıştır.

3.2.1 EYAGFLV-OH ve DYAGFLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Asidik amino asitlerin peptit serilerinin N-ucu tarafındayken ki $[M-H]^-$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumları Şekil 8'de gösterilmiştir. EYAGFLV-OH peptitinin $[M-H]^-$ iyonunun kütlesi m/z 796, diğer yandan DYAGFLV-OH peptitinin ise m/z 782'dir.

Bu iyonların gaz-fazında parçalanmaları sırasında oluşan iyonlar kütle spektrumlarında ayrı ayrı belirtilmiştir. Her iki peptit serisinde $[M-H-H_2O]^-$ iyonunun şiddeti en yüksektir. Bununla birlikte, glutamik asit içeren peptitte ikinci su kopmasının varlığı gözlemlenmiştir. Diğer yandan aspartik asit ihtiva eden seride bu iyonun varlığına rastlanılmamıştır, fakat $[M-H-35]^-$ iyonu tespit edilmiştir. $[M-H]^-$ iyonundan kopan bu nötr ayrılmanın su ve amonyak olabileceği düşünülmektedir.

b_6^- iyonlarının şiddetleri de her iki seride farklılık göstermiştir. Glutamik asitli seride b_6^- iyonun şiddeti % 12 civarındayken, aspartik asitli seride bu şiddet % 1'e düşmektedir. Genel bir bakışla, glutamik asit ihtiva eden peptit serisinde aspartik asit ihtiva edene göre daha çok parçalanma gözlemlenmiştir. Bu parçalanma sebebi glutamik asidin yan zincirinde fazladan bulunan $-CH_2$ grubundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



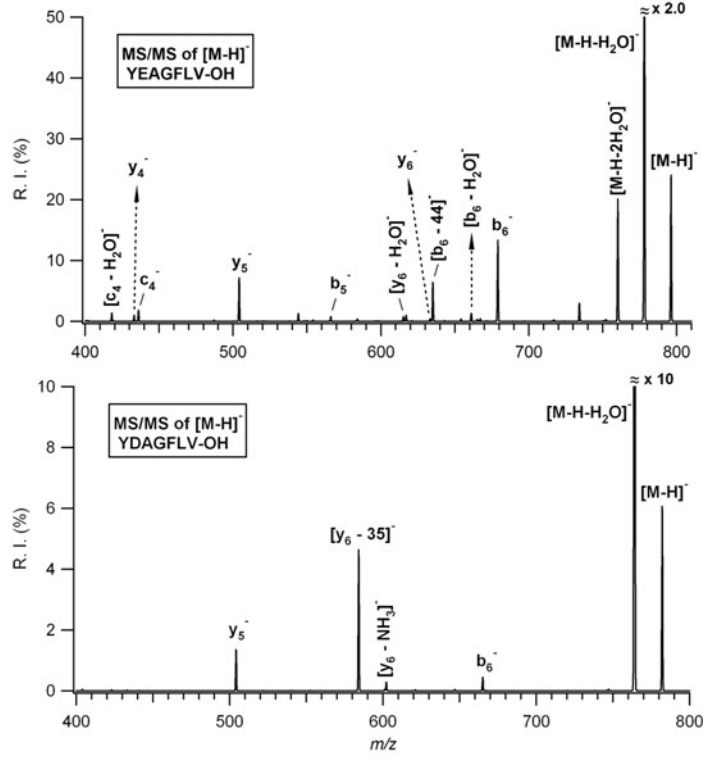
Şekil 8. EYAGFLV-OH ve DYAGFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.2.2 YEAGFLV-OH ve YDAGFLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Asidik aminoasitlerin peptit serilerinin N-ucu tarafından ikinci pozisyona geldiğinde elde edilen MS/MS kütle spektrumları Şekil 9'da gösterilmiştir. Diğer peptitlerde elde edildiği gibi $[M-H-H_2O]^-$ iyonu kütle spektrumlarında en yüksek şiddetteki iyonudur.

EYAGFLV-OH ve YEAGFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonların MS/MS kütle spektrumları neredeyse aynıdır. Tek fark birinci peptitin kütle spektrumunda y_6^- iyonu gözlemlenmişken, diğer peptitte bu iyonun şiddeti iyice azalmıştır. Buna ek olarak y_5^- , y_4^- , c_4^- , $[b_4-H_2O]^-$ ve $[c_4-H_2O]^-$ iyonları tespit edilmiştir.

Diğer yandan, YDAGFLV-OH peptitin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS kütle spektrumunda çok fazla iyonla rastlanılmamıştır. b_6^- ve y_5^- iyonlarının yanı sıra $[y_6-NH_3]^-$ ve $[y_6-35]^-$ iyonlarının varlığı saptanmıştır. y_6^- iyonundan kopan bu iki nötr molekülün aspartik asitin pozisyonu ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bu özel kopmalar glutamik asit içeren peptit serisinde gözlemlenmemiştir.



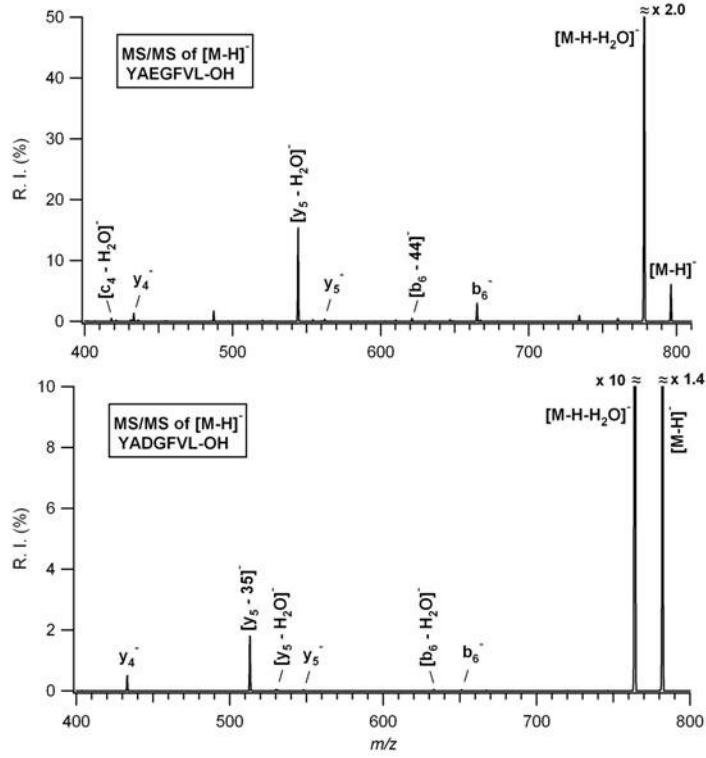
Şekil 9. YEAGFLV-OH ve YDAGFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.2.3 YAEGFVL-OH ve YADGFVL-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Bu peptit serilerinde ise asidik amino asit peptitin N-ucundan üçüncü pozisyona yerleştirilmiştir ve $[M-H]^-$ iyonlarına ait elde edilen MS/MS kütle spektumları Şekil 10'da gösterilmiştir.

Yine $[M-H-H_2O]^-$ iyonunun şiddeti en yüksektir. Glutamik asitli peptit serisinde b_6^- , y_5^- , y_4^- , $[y_5-H_2O]^-$ ve $[c_4-H_2O]^-$ iyonlarının varlığı gösterilmiştir. b_6^- iyonundan 44 kopmasının glutamik asitin yan zincirindeki $O=C=O$ (CO_2) kopması olduğu düşünülmektedir.

Aspartik asitli seride ise b_6^- , $[b_6-H_2O]^-$, y_5^- , $[y_5-H_2O]^-$, $[y_5-35]^-$ ve y_4^- iyonları oluşmuştur. $[y_5-H_2O]^-$, $[y_5-35]^-$ iyonları yine aspartik asitin pozisyonu ile alakalı oluşan iyonlardır ve peptit içinde aspartik asitin yerini göstermektedir.



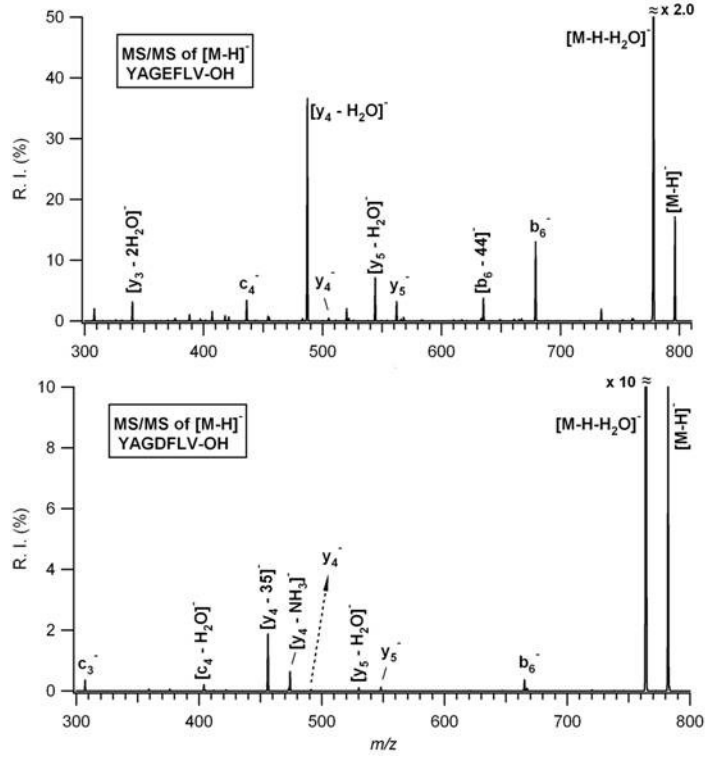
Şekil 10. YAEGFVL-OH ve YADGFVL-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.2.4 YAGEFLV-OH ve YAGDFLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Bu peptit serilerinde glutamik asit veya aspartik asit peptitin ortasına yerleştirilmiştir ve $[M-H]^-$ iyonuna ait elde edilen MS/MS spektumu Şekil 11'te gösterilmiştir. $[M-H-H_2O]^-$ iyonu yin en yüksek şiddette elde edilmiştir.

YAGEFVL-OH peptit diziliminde b_6^- , y_5^- ve y_4^- iyonları ve y iyonlarına ait su kopmaları gözlemlenmiştir. Bu iyonlara ek olarak c_4^- iyonunun varlığı tespit edilmiştir.

Diğer taraftan ise aspartik asitli peptit serisinde ise b_6^- , y_5^- , y_4^- ve c_3^- iyonlarının şiddetleri % 1altına düşmüştür. Fakat $[y_4-NH_3]^-$ ve $[y_4-35]^-$ iyonları aspartik asitin peptitin C-ucu tarafına doğru parçalanması ile oluşmaktadır ve aspartik asitin peptit içindeki pozisyonu hakkına bilgi vermektedir.



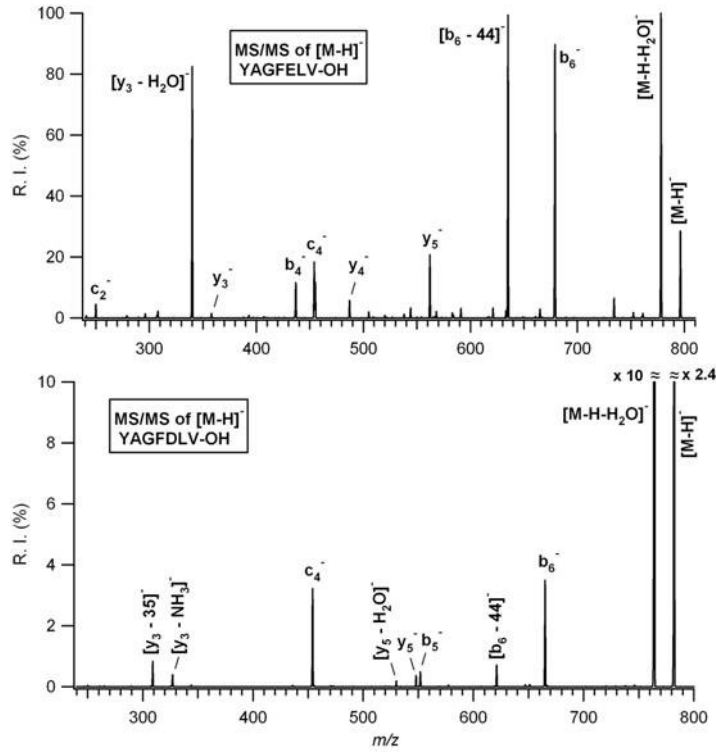
Şekil 11. YAGEFLV-OH ve YAGDFLV-OH peptitlerinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumları

3.2.5 YAGFELV-OH ve YAGFDLV-OH Peptitlerinin [M-H]⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

YAGFELV-OH ve YAGFDLV-OH peptitlerine ait [M-H]⁻ iyonlarının MS/MS kütle spektrumları Şekil 12’te gösterilmiştir. Bu peptit serilerinde asidik amino asit peptidin N-ucu tarafından beşinci pozisyona yerleştirilmiştir.

Glutamik asit içeren peptit diziliminde [M-H-H₂O]⁻ ve [b₆-44]⁻ iyonlarının şiddetleri en yüksek değerdedir. b₆⁻ iyonunun şiddeti ise diğer peptitlere kıyasla en yüksek şiddetindedir. y₅⁻, y₄⁻, c₄⁻, b₄⁻, y₃⁻, [y₃-H₂O]⁻ ve c₂⁻ iyonları tespit edilmiştir. [y₃-H₂O]⁻ iyonunun yüksek şiddette olması da y iyonunun oluşum mekanizması ile alakalı olduğu düşünülmektedir ve sadece bu peptite özgüdür.

YAGFDLV-OH peptit diziliminde ise b₆⁻ ve [b₆-44]⁻ iyonlarının şiddetleri % 5’in altındadır. b₅⁻, y₅⁻, [y₅-H₂O]⁻ ve c₄⁻ iyonları az da olsa elde edilmiştir. Bunlara ek olarak, [y₃-NH₃]⁻ ve [y₃-35]⁻ iyonları aspartik asidin pozisyonunu belirleyen iyon türleri olarak tespit edilmiştir.

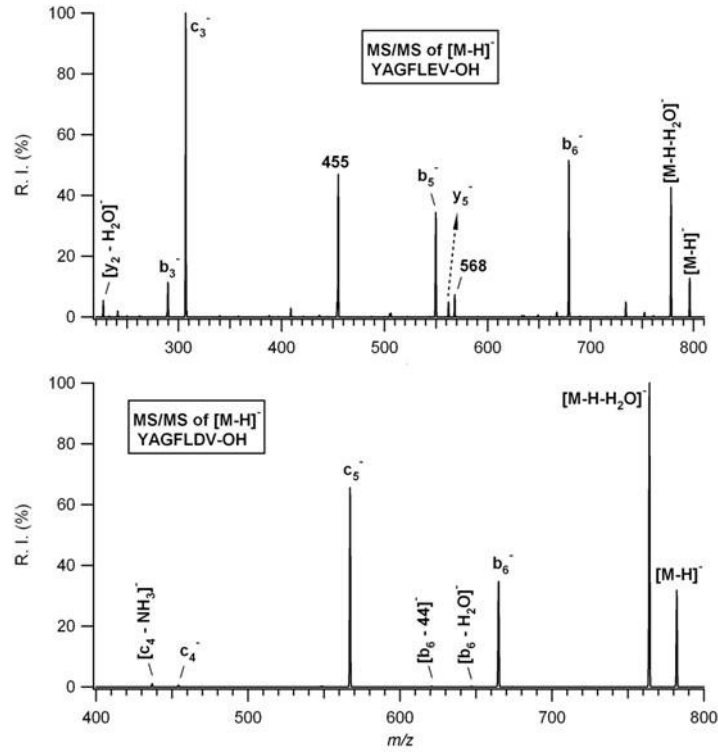


Şekil 12. YAGFELV-OH ve YAGFDLV-OH peptitlerinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumları

3.2.6 YAGFLEV-OH ve YAGFLDV-OH Peptitlerinin [M-H]⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

YAGFLEV-OH ve YAGFLDV-OH peptitlerine ait [M-H]⁻ iyonlarının MS/MS kütle spektrumları Şekil 13'te gösterilmiştir. Glutamik asiti içeren peptit serisinde b_6^- , b_5^- , y_5^- , c_3^- ve b_3^- iyonları saptanmıştır. Diğer peptitlerden farklı olarak [M-H-H₂O]⁻ iyonunun şiddeti azalmıştır ve en yüksek şiddetteki iyon c_3^- 'dür. Diğer yandan, m/z 568 ve 455 iyonları oluşmuştur ve bu iyonlar kütleleri herhangi bir b , c veya y iyonlarının kütlelerine denk gelmemektedir. Bu iki iyon sırasıyla YAGFL-OH ve YAGF-OH peptitlerinin [M-H]⁻ iyonlarının kütleleri ile uyumaktadır.

Aspartik asitli seride ise [M-H-H₂O]⁻ iyonu yine en yüksek şiddetteki iyonudur. b_6^- ve c_5^- iyonları ana iyonlardır. b_6^- iyonundan hem su hem de CO₂ kopması mevcuttur ve c_4^- 'ten amonyak kopması gözlemlenmiştir. Ek olarak, aspartik asitli diğer peptitlerde gözlemlenen özel y iyonları bu peptit diziliminde elde edilmemiştir. Bunun nedeni olarak da aspartik asidin peptitin C-ucuna yaklaşması olarak düşünülmüştür.



Şekil 13. YAGFLEV-OH ve YAGFLDV-OH peptitlerinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumları

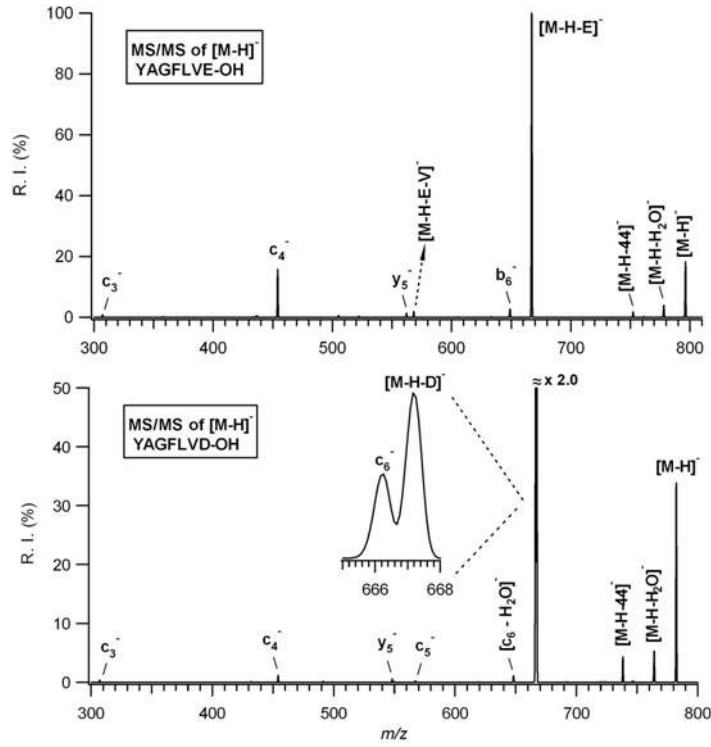
3.2.7 YAGFLVE-OH ve YAGFLVD-OH Peptitlerinin [M-H]⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Asidik amino asitlerin peptit serilerinin C-ucu tarafındayken ki [M-H]⁻ iyonlarının MS/MS kütle spektrumları Şekil 14'de gösterilmiştir. Her iki peptit için [M-H-H₂O]⁻ iyonlarının şiddetleri iyice azalmıştır. Bu durum ise başka bir mekanizmanın daha baskın olduğunun bir göstergesidir.

Hem YAGFLVE-OH hem de YAGFLVD-OH peptitlerinde son pozisyondaki glutamik asit (*m/z* 667) ve aspartik asit kopmaları (*m/z* 667) en yüksek şiddette elde edilmiştir. Bu kopmaların mekanizması daha önceki raporumuzda belirtilmiştir.

Glutamik asitli seride *b*₆⁻, *y*₅⁻, *c*₄⁻ ve *c*₃⁻ iyonları mevcuttur ve iyon şiddetleri *c*₄⁻ iyonu dışında % 5 seviyesinin altındadır ve *c*₄⁻ iyonun şiddeti % 20 seviyesindedir. *c*₄⁻ iyonunun şiddeti diğer *c* iyonlarına oranla yüksek olması bu iyonun gaz-fazı yapısının farklı olduğunun bir göstergesidir ve bu konuda çalışmalarımız devam etmektedir.

Aspartik asitli seride ise *c*₅⁻, *y*₅⁻, *c*₄⁻ ve *c*₃⁻ iyonlarının şiddetleri % 2'in altındadır. Diğer yandan *c*₆⁻ iyonun (*m/z* 666) şiddeti % 50 seviyesindedir ve [M-H-D]⁻ kopması (*m/z* 667) ile yan yanadır. Bu iyon glutamik asitli seride rastlanılmamıştır.



Şekil 14. YAGFLVE-OH ve YAGFLVD-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3. YAGFLV ve Birden Fazla Glutamik Asit veya Aspartik Asit İçeren Model Peptitlerin Negatif İyonlarının Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

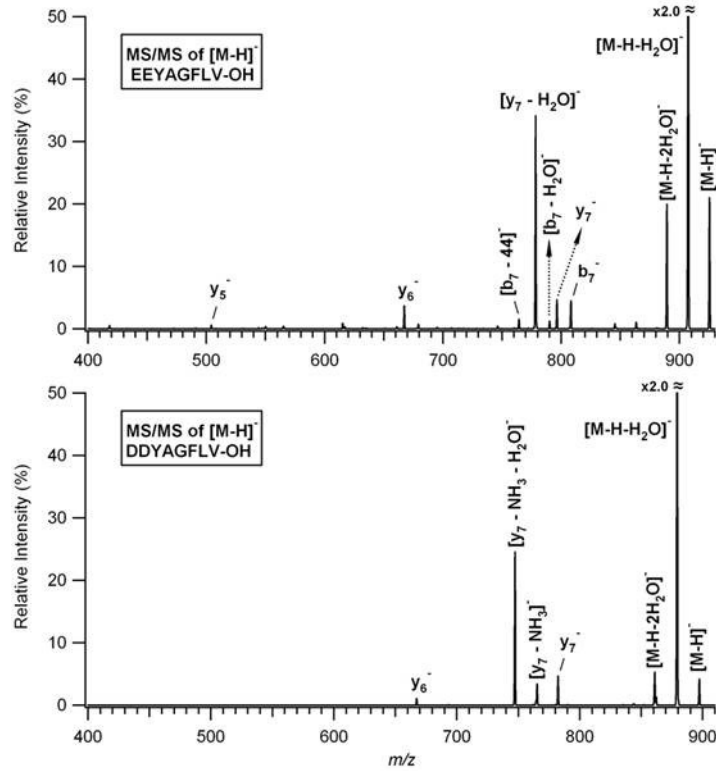
Projenin önceki bölümlerinde elde edilen sonuçlardan sonra, ikili ve üçlü yan yana glutamik asit (Glu, E) veya aspartik asit (Asp, D) içeren model peptitlerin negatif iyonlarının ($[M-H]^-$) MS/MS kütle spektrumları karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Peptit sekansındaki E, D, Y, A, G, F, L ve V harfleri sırasıyla glutamik asit, aspartik asit, trozin, alanin, glisin, fenilalanin, lösin ve valin amino asitlerini göstermektedir.

3.3.1 EEYAGFLV-OH ve DDYAGFLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

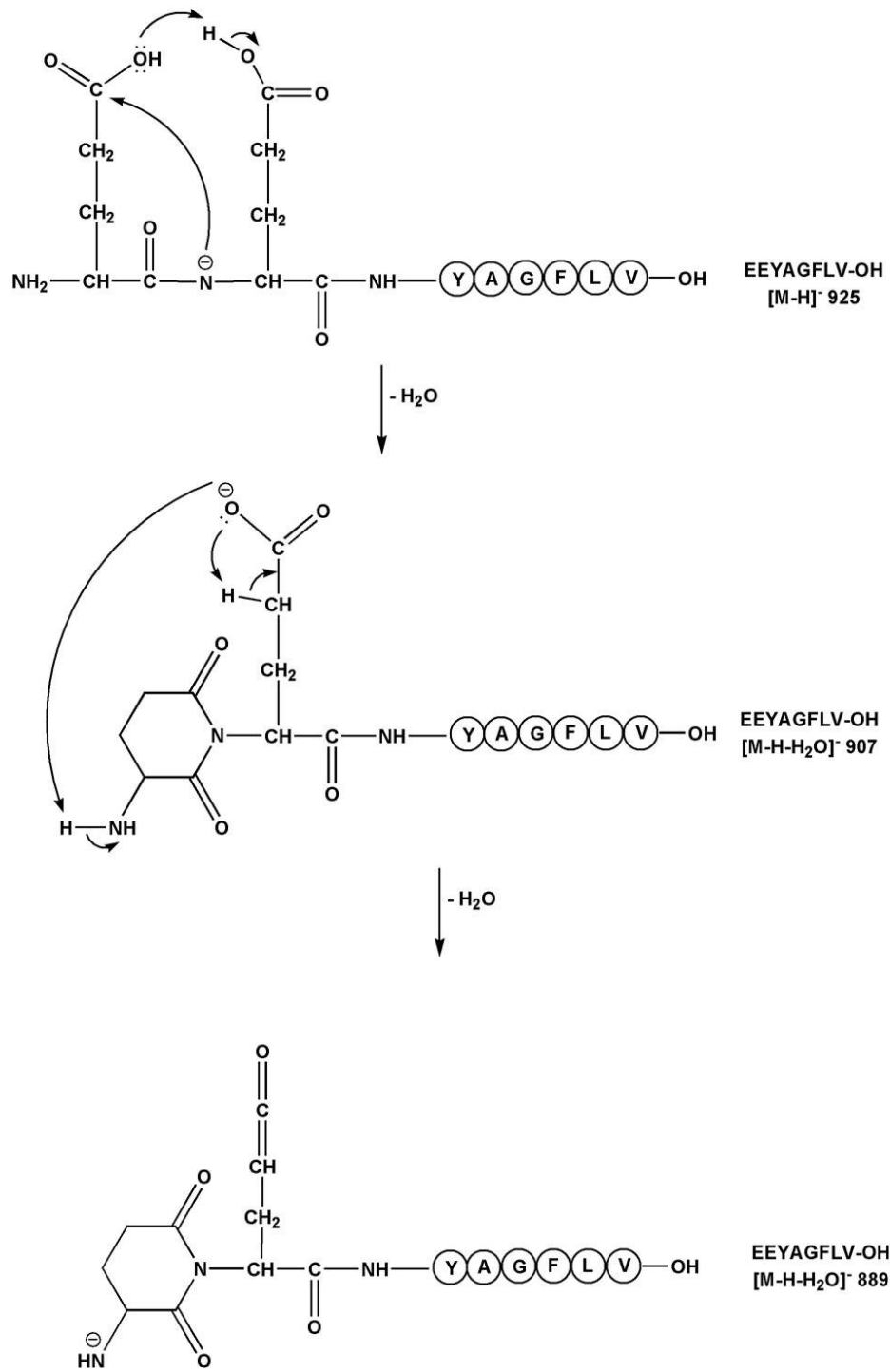
İkili asidik amino asitler model peptitlerin N-ucu tarafındayken elde edilen $[M-H]^-$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumları Şekil 15'de gösterilmiştir. EEYAGFLV-OH peptitinin $[M-H]^-$ iyonunun kütlesi m/z 925, diğer yandan DDYAGFLV-OH peptitinin ise m/z 897'dir.

Her iki peptit serisinde de $[M-H-H_2O]^-$ ve $[M-H-2H_2O]^-$ iyonlarının varlığı gözlemlenmiştir. Bu model peptitler ikişer tane asidik amino asit içerdikleri için $[M-H]^-$ iyonundan iki tane su kopması doğal olarak beklenmektedir. Bu peptite ait $[M-H]^-$ iyonundan tekli ve çiftli su kopma mekanizması Şekil 16'da gösterilmiştir.

Glutamik asit içeren peptit serisinde b_7^- iyonu saptanmıştır. Fakat bu iyon aspartik asit içeren peptitte bulunmamaktadır. Bu iyon glutamik ve aspartik asiti birbirinden ayıran bir iyon olarak kabul edilebilir. Her iki peptit serisinde de y_7^- ve y_6^- iyonları vardır. Buna ek olarak EEYAGFLV-OH peptitin $[M-H]^-$ iyonunun MS/MS spektrumunda y_5^- iyonunun varlığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ikinci dönem raporunda gösterilen sonuçlar ile (EYAGFLV-OH ve DYAGFLV-OH) uyum içindedir ve sonuçlar birbirlerini desteklemektedirler.



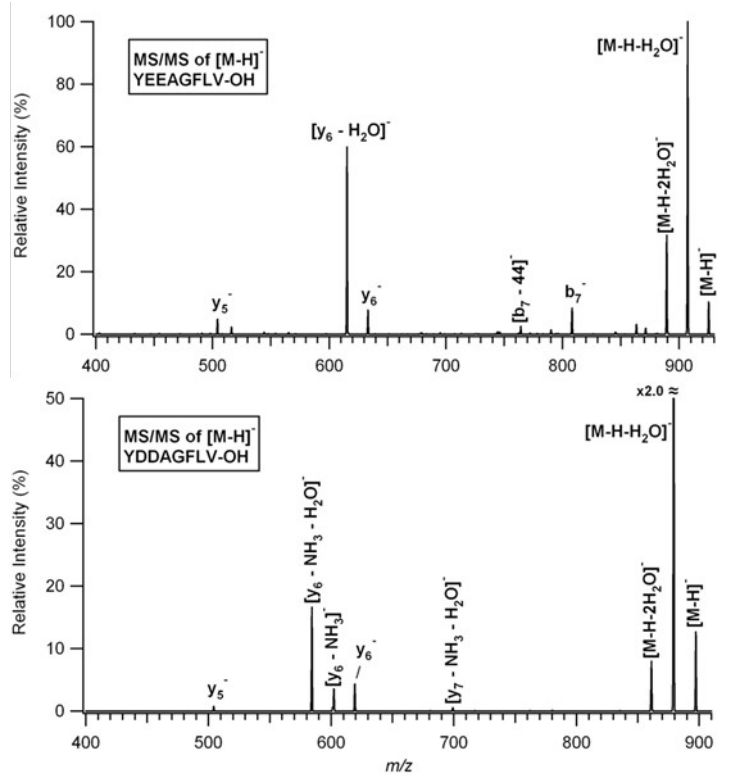
Şekil 15. EEYAGFLV-OH ve DDYAGFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları



Şekil 16. EEYAGFLV-OH peptiti $[M-H]^-$ iyonundan su kopma mekanizması

3.3.2 YEEAGFLV-OH ve YDDAGFLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

İkili amino asitler peptit serilerinin N-ucu tarafından ikinci ve üçüncü pozisyona geldiğinde elde edilen MS/MS kütle spektrumları Şekil 17'da gösterilmiştir. Her iki peptit serisinin $[M-H]^-$ iyonlarında su kopmaları yine gözlemlenmiştir.

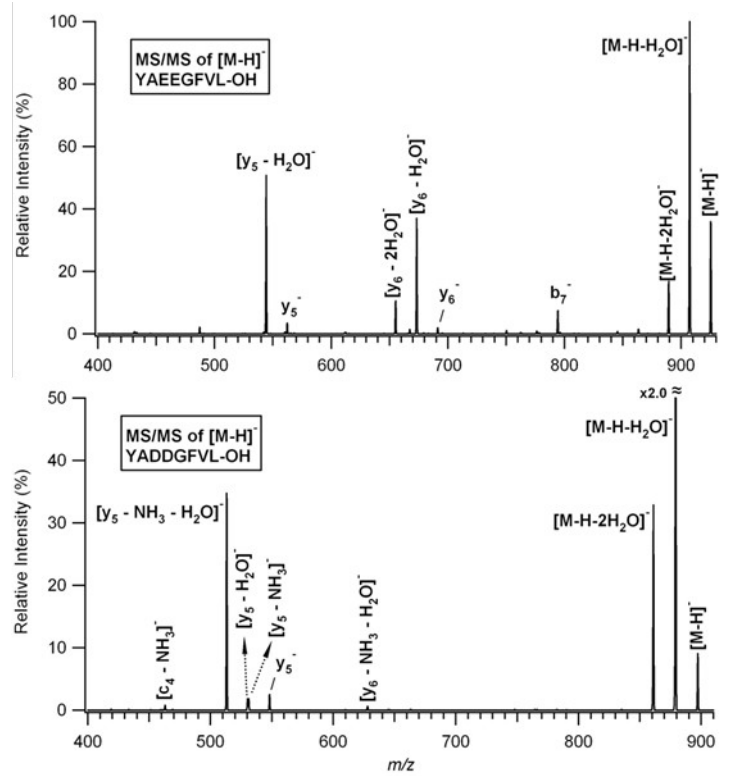


Şekil 17. YEEAGFLV-OH ve YDDAGFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

Buna ek olarak y_6^- iyonu hem glutamik asit hem de aspartik asit içeren peptitte bulunmaktadır. YEEAGFLV-OH peptitinde $[y_6 - H_2O]^-$ iyonunun şiddeti yüksektir. YDDAGFLV-OH peptitinde ise bu iyon yerine $[y_6 - NH_3]^-$ kopması gözlemlenmiştir. Bu iki iyonun varlığı peptit serisinde glutamik asitin yada aspartik asitin varlığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ek olarak, aspartik asit içeren peptitte $[y_6 - NH_3 - H_2O]^-$ iyonu belirgindir. Diğer yandan YEEAGFLV-OH'de b_7^- iyonu saptanmıştır, YDDAGFLV-OH ise bu iyon yoktur.

3.3.3 YAEEGFVL-OH ve YADDGFVL-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Asidik amino asitler üçüncü ve dördüncü pozisyonlara geldiğinde elde edilen $[M-H]^-$ iyonlarının MS/MS spektrumları Şekil 18'te karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. $[M-H-H_2O]^-$ ve $[M-H-2H_2O]^-$ iyonları her iki peptit için yine görülmüştür. Glutamik asit içeren peptit serisinde b_7^- iyonunun varlığı gözlemlenmiştir. bununla birlikte y_6^- , $[y_6-H_2O]^-$, $[y_6-2H_2O]^-$, y_5^- ve $[y_5-H_2O]^-$ iyonları da saptanmıştır. Aspartik asitli seride ise y_5^- , $[y_5-H_2O]^-$, $[y_5-NH_3]^-$ ve $[y_5-NH_3-H_2O]^-$ iyonlarının varlığı gözlemlenmiştir. Diğer yandan YADDGFVL-OH peptit serisinde $[c_4-NH_3]^-$ iyonu çok düşük şiddette saptanmıştır. Bu iyon aspartik asitlerin peptit içindeki pozisyonları ile alakalı olduğu düşünülmektedir ve glutamik asitli seride bu iyon rastlanılmamıştır.

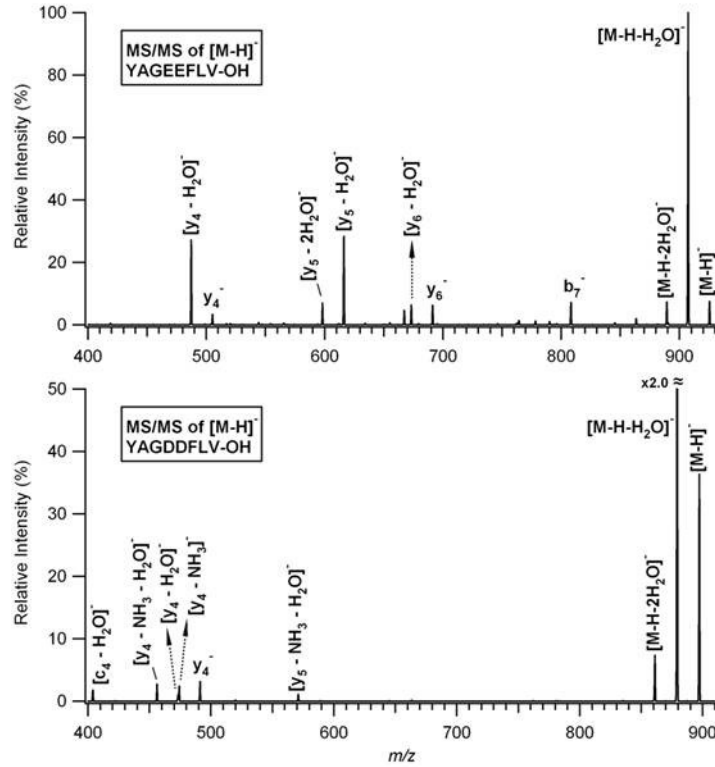


Şekil 18. YAEEGFVL-OH ve YADDGFVL-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.4 YAGEEFLV-OH ve YAGDDFLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Bazı model peptitlerde ise ikili asidik amino asitler peptitin tam ortasına yerleştirilmiştir ve elde edilen $[M-H]^-$ iyonlarının MS/MS spektrumu Şekil 19'de gösterilmiştir. $[M-H]^-$ iyonundan tekli ve çiftli su kopmaları yine gözlemlenmiştir. YAGEEFLV-OH peptitinde y_6^- , $[y_6-H_2O]^-$, $[y_6-2H_2O]^-$, $[y_5-2H_2O]^-$, y_4^- ve $[y_4-H_2O]^-$ iyonları ile b_7^- iyonu saptanmıştır.

Diğer yandan aspartik asitli peptit serisinde ise $[y_5-NH_3-H_2O]^-$, y_4^- , $[y_4-NH_3]^-$, $[y_4-H_2O]^-$ ve $[y_4-NH_3-H_2O]^-$ iyonlarının varlığı gözlemlenmiştir. Bu iyonlara ek olarak $[C_4-H_2O]^-$ iyonu belirgindir. Bu iyon glutamik asitli peptitte görülmemiştir.

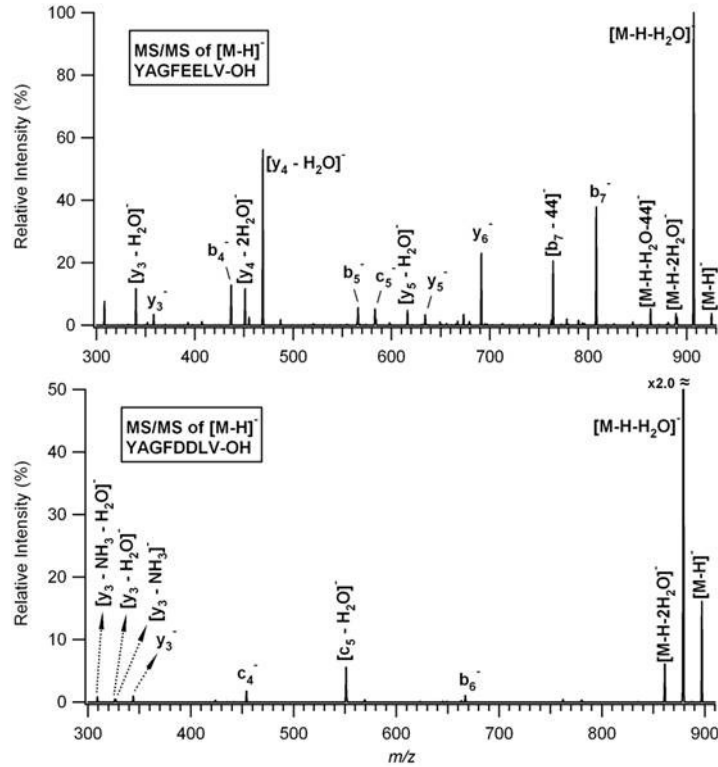


Şekil 19. YAGEEFLV-OH ve YAGDDFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.5 YAGFEELV-OH ve YAGFDDLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Pozisyon etkisi araştırılmasında ise, ikili asidik amino asitler peptitlerin N-ucu tarafından beşinci ve altıncı sırasındadırlar. Genel bir bakışla glutamik asitli peptit aspartik

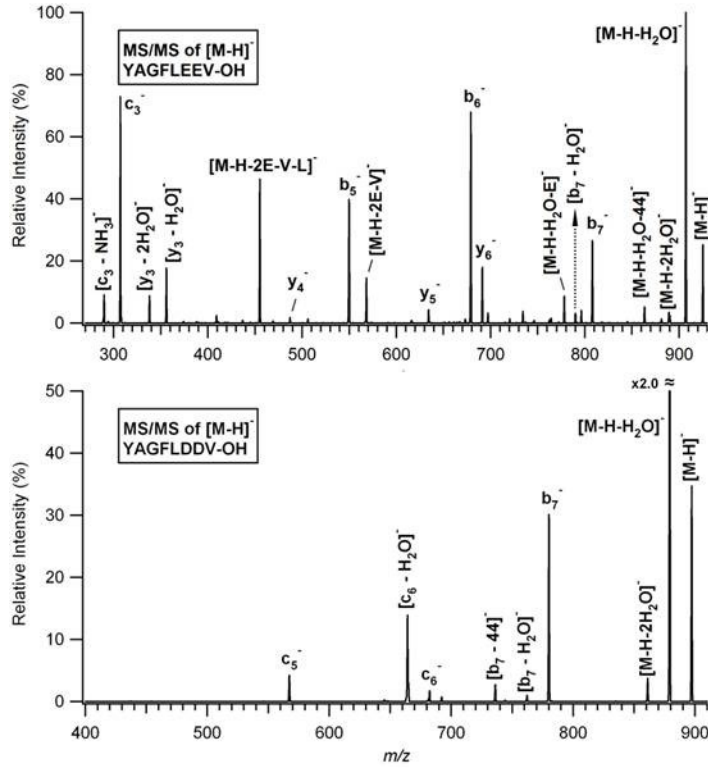
asitli peptite göre daha fazla parçalanma ürünü içermektedir (Şekil 20). YAGFEELV-OH peptitin parçalanması sırasında b_7^- , $[b_7-44]^-$, y_6^- , c_5^- , b_5^- ve b_4^- iyonları saptanmıştır. Bu iyonlar YAGFDDLV-OH peptitin parçalanması sırasında gözlemlenmemiştir. Aspartik asitli seride ise b_6^- , c_5^- ve $[c_5-H_2O]^-$ iyonları saptanmıştır ve bu iyonlar glutamik asitli peptitte yoktur. Bu iyonların varlığı (yada yokluğu) peptitte asidik amino asitin çeşidi hakkında bilgi vermektedir.



Şekil 20. YAGFEELV-OH ve YAGFDDLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.6 YAGFLEEV-OH ve YAGFLDDV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

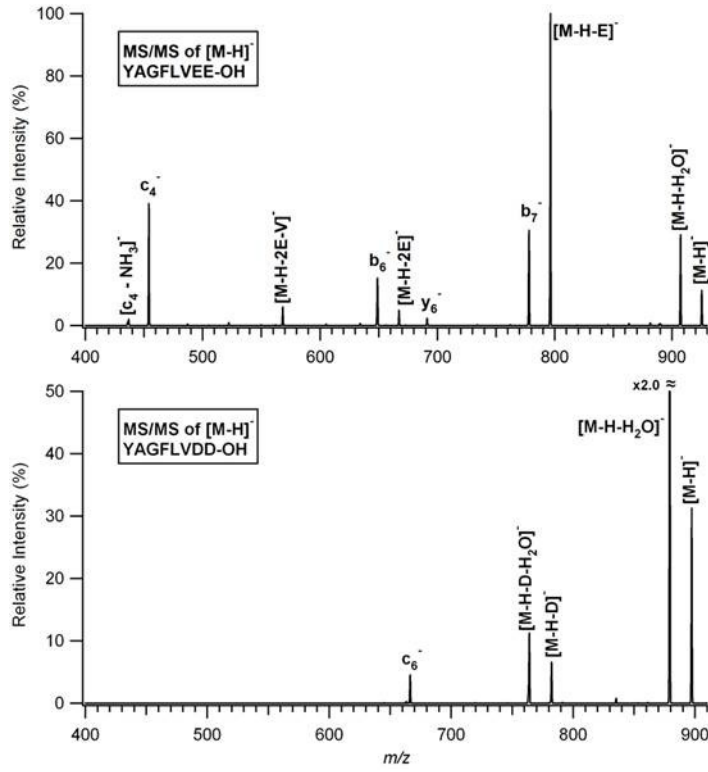
YAGFLEEV-OH ve YAGFLDDV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumları Şekil 21'de gösterilmiştir. Aspartik asitli peptitte c_6^- , $[c_6-H_2O]^-$ ve c_5^- iyonlarının yanı sıra b_7^- , $[b_7-H_2O]^-$ ve $[b_7-44]^-$ iyonları görülmüştür. Glutamik asitli peptit ise daha karmaşık bir parçalanma mekanizması izlemektedir. y_6^- , y_5^- , y_4^- , b_7^- , b_6^- ve b_5^- iyonlarının yanı sıra $[M-H-2E-V]^-$ ve $[M-H-2E-V-L]^-$ iyonları mevcuttur. Glutamik asitli peptitte c_3^- iyonun şiddeti oldukça yüksektir ve bu iyon aspartik asitli peptitte gözlemlenmemiştir.



Şekil 21. YAGFLEEV-OH ve YAGFLDDV-OH peptitlerinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.7 YAGFLVEE-OH ve YAGFLVDD-OH Peptitlerinin [M-H]⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

İkili amino asitler peptitlerin C-ucuna yerleştirildiğinde elde edilen kütle spektrumları diğer peptitlerin parçalanma reaksiyonlarına göre daha az parçalanma ürünü içermektedir (Şekil 22). Ama baskın olarak peptitlerin C-ucu tarafındaki asidik amino asitlerin kopmaları gözlemlenmiştir. YAGFLVEE-OH peptit serisinde en şiddetli iyon [M-H-E]⁻ kopmasıdır ve [M-H-2E]⁻ iyonu da az da olsa görülmektedir. Bunlara ek olarak b_7^- , y_6^- , b_6^- ve c_4^- iyonları da glutamik asitli peptit serisinde görülmektedir. Bu iyonlar YAGFLVDD-OH peptitte gözlemlenmemiştir. Bu peptitte c_6^- iyonu saptanmıştır ve glutamik asitli seride bu iyon yoktur. Bu iyonlara ek olarak peptitin C-ucu tarafındaki tekli aspartik asit kopması gözlemlenirken ikinci aspartik asit kopması yoktur.

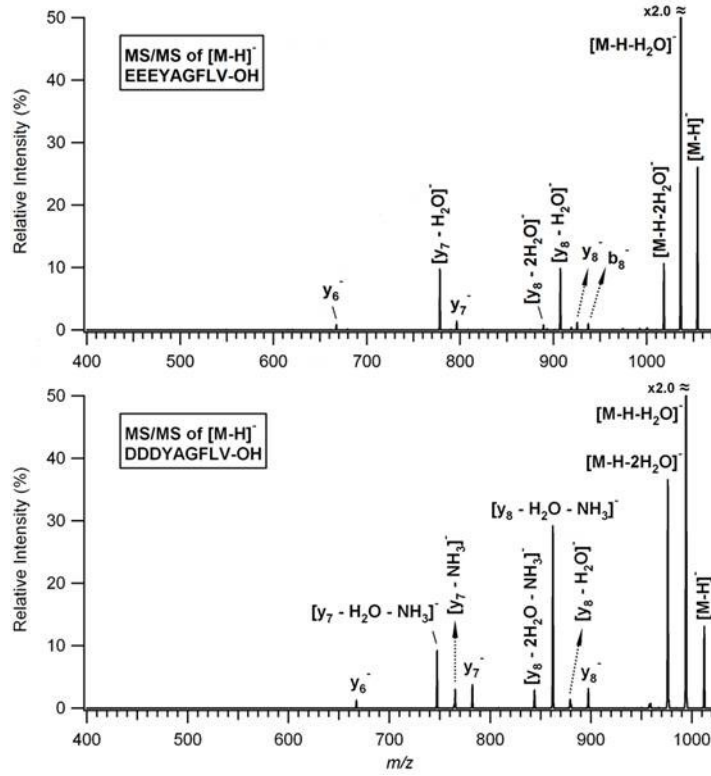


Şekil 22. YAGFLVEE-OH ve YAGFLVDD-OH peptitlerinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.8 EEEYAGFLV-OH ve DDDYAGFLV-OH Peptitlerinin [M-H]⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Üçlü asidik amino asit içeren peptit serileri de genel olarak ikili amino asit içeren peptit serilerinin parçalanma mekanizmalarına benzemektedir (Şekil 23). [M-H]⁻ iyonundan hem tek hem de çift su kopmaları ([M-H-H₂O]⁻ ve [M-H-2H₂O]⁻) mevcuttur ve tüm üçlü glutamik asit veya aspartik asit içeren peptitlerde gözlemlenmiştir.

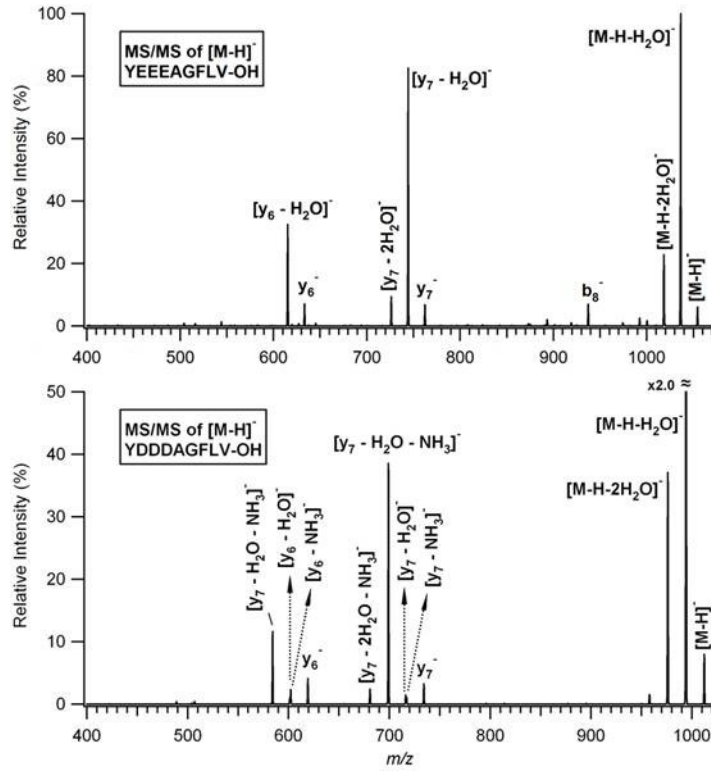
Asidik amino asitler peptitlerin N-ucu pozisyonundayken parçalanma ürünlerinin şiddetleri düşüktür. Her iki seride y₈⁻, y₇⁻ ve y₆⁻ iyonları ve iyonlara ait ya su kopması ya da amonyak kopması görülmüştür. Özellikle amonyak kopması aspartik asitli peptit serisinde bulunmaktadır. EEEYAGFLV-OH peptitte b₈⁻ iyonu şiddeti düşük olsa da saptanmıştır. Bu iyon DDDYAGFLV-OH peptitte gözlemlenmemiştir.



Şekil 23. EEEYAGFLV-OH ve DDDYAGFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.9 YEEEAGFLV-OH ve YDDDAGFLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

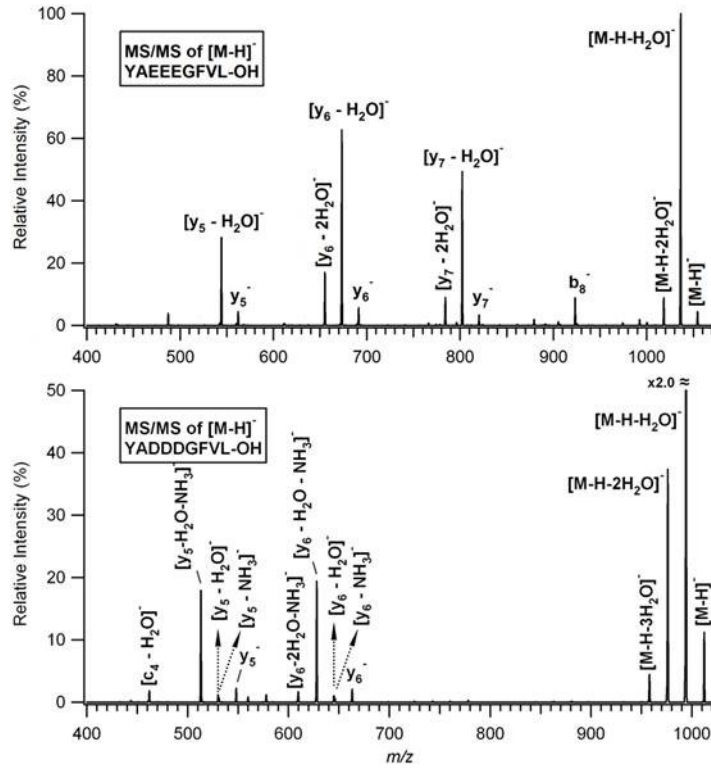
Üçlü asidik amino asitler N-ucu tarafından ikinci, üçüncü ve dördüncü sıraya yerleştirildiklerinde ikinci asidik ve üçüncü asidik amino asitin arasındaki peptit bağının kopması sonucu oluşan iyonlar kütle spektrumunda baskın olmaktadır (Şekil 24). Glutamik asitli seride $[y_7-H_2O]^-$ iyonu, aspartik asitli seride ise $[y_7-H_2O-NH_3]^-$ iyonu $[M-H-H_2O]^-$ ionundan sonra en yüksek şiddetteki iyonlardır. Ek olarak, her iki seride y_7^- ve y_6^- iyonları vardır. YEEEAGFLV-OH peptitte b_8^- iyonu şiddeti bir önceki peptite göre yükselmiştir.



Şekil 24. YEEEAGFLV-OH ve YDDDAGFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.10 YAEEEGFVL-OH ve YADDDGFVL-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Bu seride ise y_7^- , y_6^- , y_5^- , $[y_7-H_2O]^-$, $[y_6-H_2O]^-$, $[y_5-H_2O]^-$, $[y_7-2H_2O]^-$ ve $[y_6-2H_2O]^-$ iyonları kütle spektrumunda görülmüştür (Şekil 25). b_8^- iyonunun şiddeti belirgin bir şekildedir. Diğer yandan YADDDGFVL-OH peptit serisinde ise y_6^- ve y_5^- iyonları ve iyonlara ait su ve amonyak kopmaları gözlemlenmiştir. Ayrıca $[c_4-H_2O]^-$ iyonu da saptanmıştır. Bu iyon YAEEEGFVL-OH peptitte yoktur.

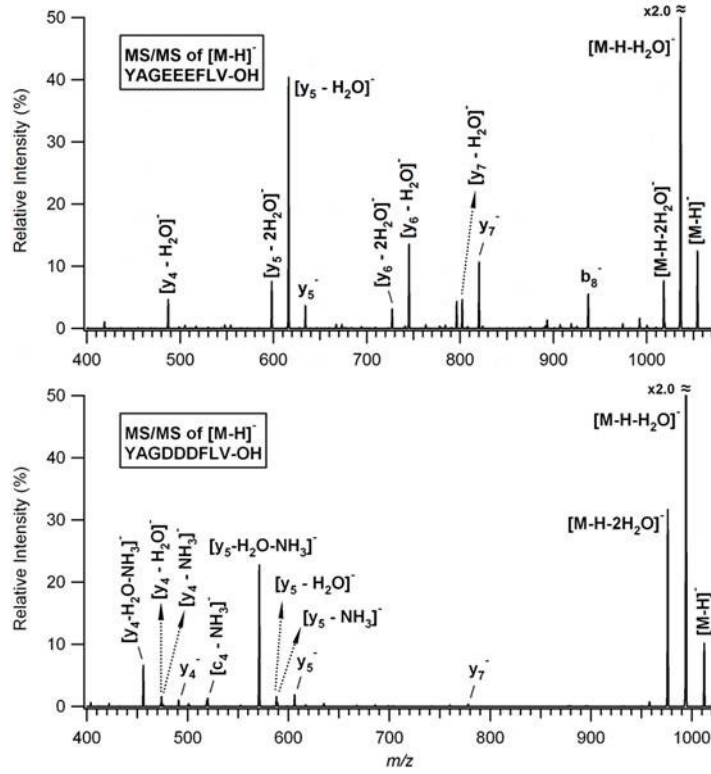


Şekil 25. YAEEEGFVL-OH ve YADDDGFVL-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.11 YAGEEFLV-OH ve YAGDDDFLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Üçlü asidik amino asitler peptitlerin tam ortasına yerleştirildiklerinde glutamik asitli peptitte y_7^- , y_5^- , $[y_7-H_2O]^-$, $[y_6-H_2O]^-$, $[y_6-2H_2O]^-$, $[y_5-H_2O]^-$, $[y_5-2H_2O]^-$ ve y_4^- ionları baskın olarak görülmektedir ve b_8^- iyonu da diğer glutamik asitli peptitlerdeki olduğu gibi gözlemlenmiştir. Bu iyon yine aspartik asitli peptitte görülmemiştir (Şekil 26).

Diğer yandan, YAGDDDFLV-OH peptitinin $[M-H]^-$ iyonu parçalanması sırasında y_5^- , y_4^- , $[y_5-NH_3]^-$, $[y_5-H_2O]^-$, $[y_5-H_2O-NH_3]^-$, $[y_4-NH_3]^-$, $[y_4-H_2O]^-$ ve $[y_4-H_2O-NH_3]^-$ ionları saptanmıştır. Ayrıca $[c_4-NH_3]^-$ iyonu da aspartik asitli peptitte gözlemlenmiştir.

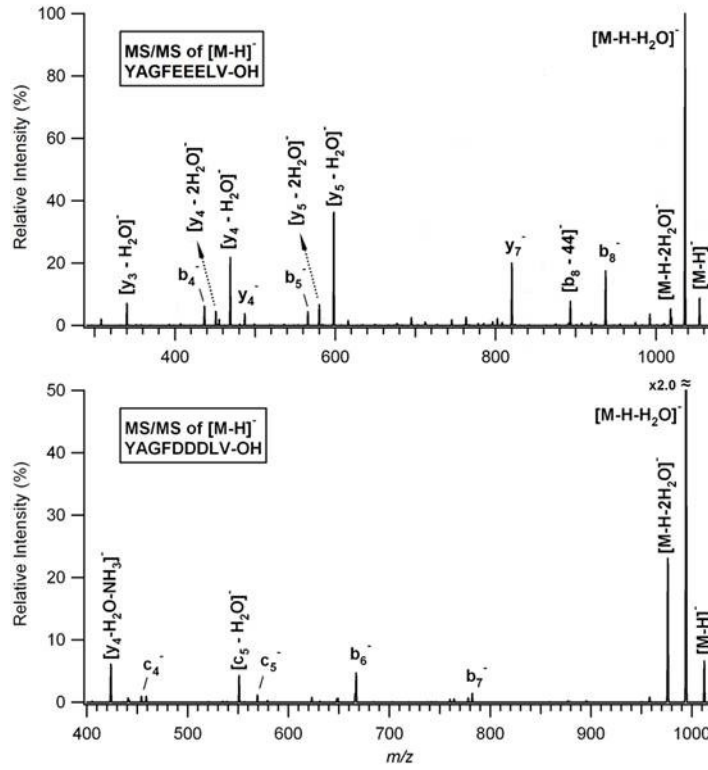


Şekil 26. YAGEEEEFLV-OH ve YAGDDDFLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.12 YAGFEEELV-OH ve YAGFDDDLV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Üçlü glutamik asit içeren peptitin parçalanma ürünleri aspartik asit içeren peptite göre daha fazladır (Şekil 27). YAGFEEELV-OH peptitinin $[M-H]^-$ iyonunun parçalanması sırasında b_8^- , b_5^- ve b_4^- iyonlarını oluşturmuştur. Ek olarak, $[b_8-44]^-$ iyonu da gözlemlenmiştir. Ayrıca y_7^- ve y_4^- iyonları ve $[y_5-H_2O]^-$, $[y_5-2H_2O]^-$, $[y_4-H_2O]^-$, $[y_4-2H_2O]^-$ ve $[y_3-H_2O]^-$ iyonlarında gaz fazında saptanmıştır.

Diğer yandan YAGFDDDLV-OH peptitin parçalanma ürünleri çok azdır ve iyon şiddetleri oldukça düşüktür. Oluşan iyonlar ise b_7^- , b_6^- , c_5^- , c_4^- , $[c_5-H_2O]^-$ ve $[y_4-H_2O-NH_3]^-$ 'dir.

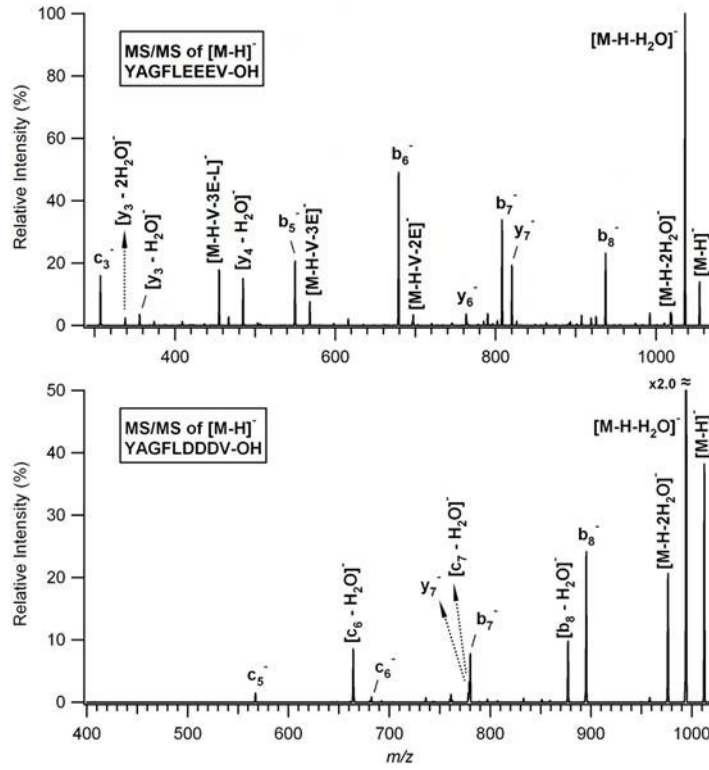


Şekil 27. YAGFEEELV-OH ve YAGFDDDLV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.13 YAGFLEEEV-OH ve YAGFLDDDV-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

YAGFLEEEV-OH peptitin parçalanması sırasında elde edilen iyonlar b ve y iyonlarıdır ve bazı y iyonlarından su kopmaları mevcuttur. Bu iyonlara ek olarak $[M-H-V-2E]^-$, $[M-H-V-3E]^-$ ve $[M-H-V-3E-L]^-$ iyonları mevcuttur. Aspartik asitli peptitte bu iyonlara benzer iyonlar yoktur. Ayrıca glutamik asitli peptitte c_3^- iyonu gözlemlenmiştir (Şekil 28).

YAGFLEEEV-OH peptitin parçalanması sırasında ise b_8^- , $[b_8-H_2O]^-$, b_7^- , y_7^- , $[c_7-H_2O]^-$, c_6^- , $[c_6-H_2O]^-$ ve c_5^- iyonları saptanmıştır ve genel bir bakışla daha az parçalanma ürünleri içermektedir.

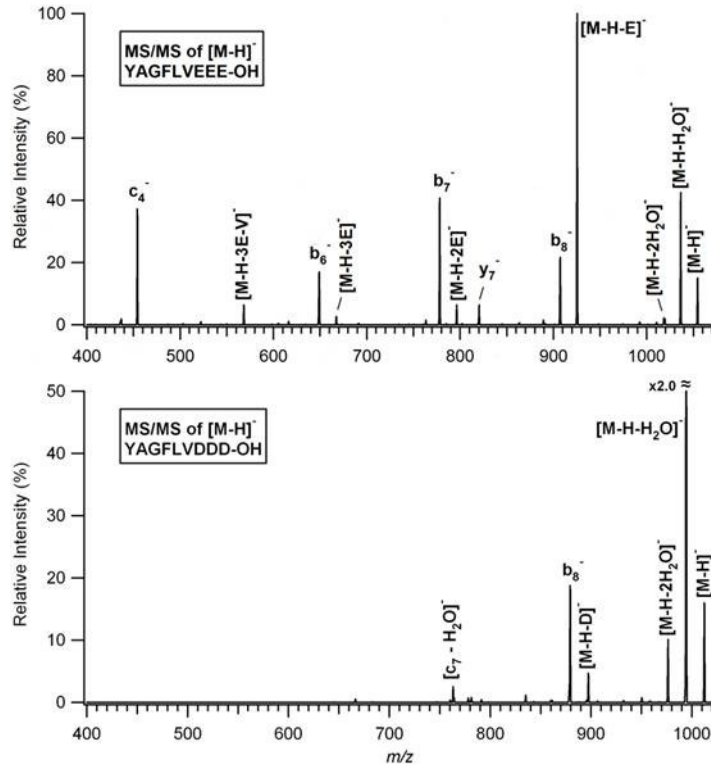


Şekil 28. YAGFLEEEV-OH ve YAGFLDDDV-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.14 YAGFLVEEE-OH ve YAGFLVDDD-OH Peptitlerinin $[M-H]^-$ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

Üçlü asidik amino asitler peptitlerin C-ucu pozisyonunda iken elde edilen $[M-H]^-$ iyonlarının kütle spektrumları Şekil 29'de gösterilmiştir. Glutamik asitli seride $[M-H-E]^-$, $[M-H-2E]^-$ ve $[M-H-3E]^-$ iyonları beklendiği gibi saptanmıştır. Ayrıca b_8^- , y_7^- , b_6^- ve c_4^- iyonları gözlemlenmiştir. c_4^- iyonu diğer c iyonlarına göre farklı yapıda olduğu düşünülmektedir ki bu yüzden kütle spektrumda % 40 şiddetinde elde edilmiştir.

Diğer yandan aspartik asitli peptitte ise parçalanma ürünleri daha azdır. $[M-H]^-$ iyonundan tekli aspartik asit kopması ($[M-H-D]^-$) saptanmıştır. Fakat ikinci veya üçüncü aspartik asit kopması belirgin değildir. Bu iyon ek olarak b_8^- ve $[c_7-H_2O]^-$ iyonları da gözlemlenmiştir.



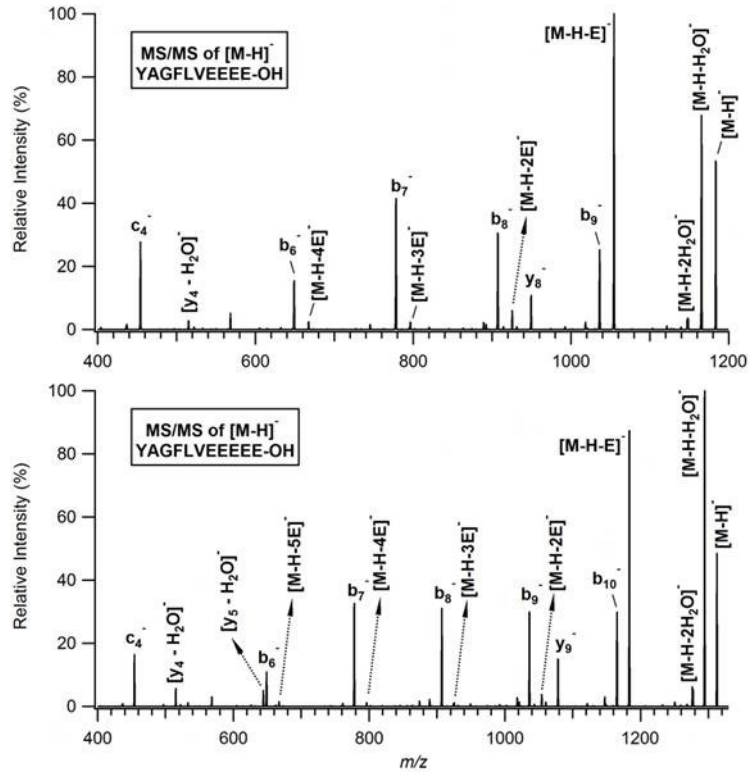
Şekil 29. YAGFLVEEEE-OH ve YAGFLVDDD-OH peptitlerinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumları

3.3.15 Peptit C-ucunda Dörtlü ya da Beşli Asidik Amino Asit İçeren Model Peptitlerin [M-H]⁻ İyonu Gaz-Fazı Parçalanma Reaksiyonları

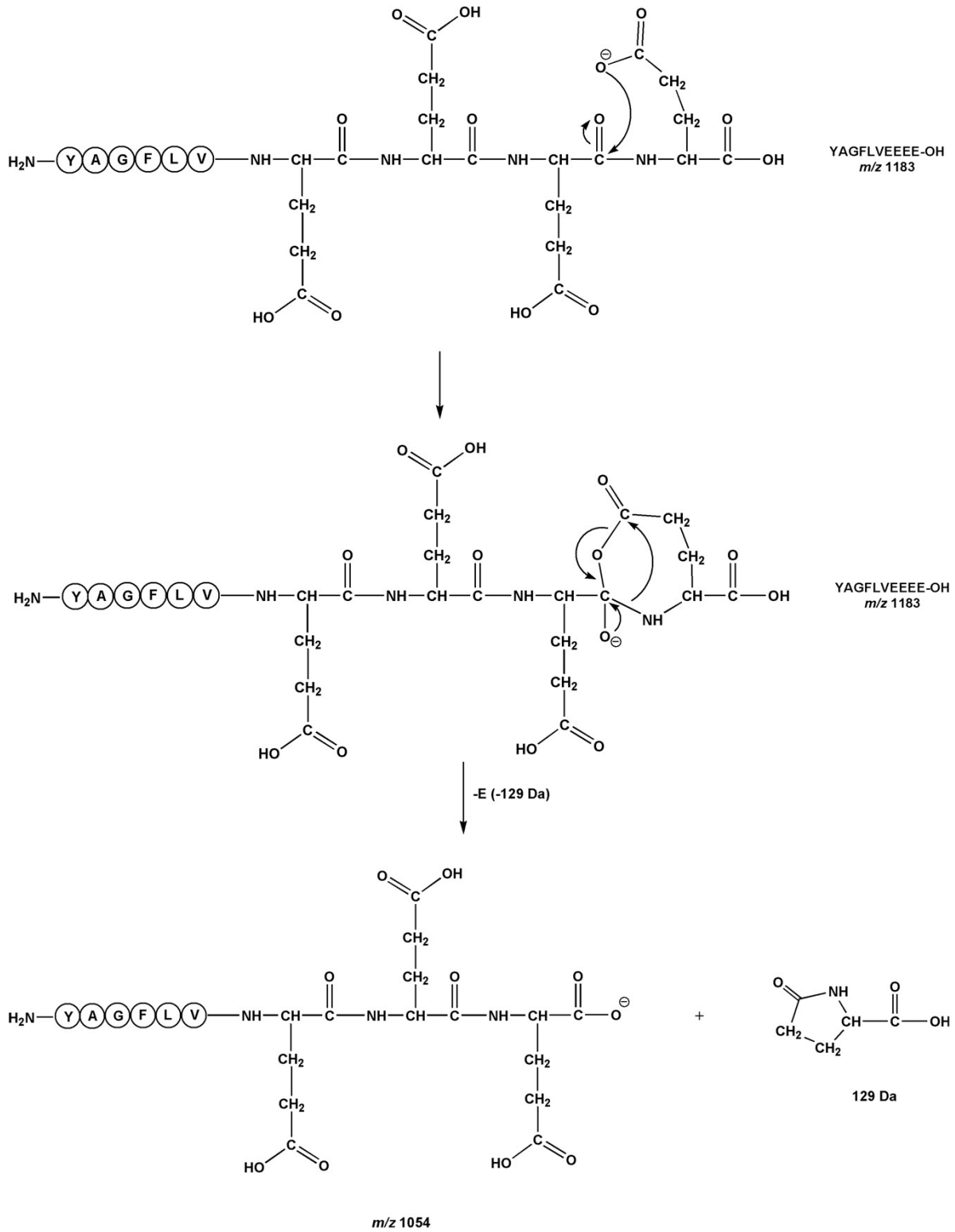
Bazı model peptitlerin C-ucuna dört ya da beş tane tane yan yana glutamik veya aspartik asit amino asitleri yerleştirilmiştir. Peptitlerin C-ucundaki ardışık asidik amino asitlerin kopmaları gözlemlenmek istenmektedir.

Glutamik asit içeren peptitlerin [M-H]⁻ iyonlarının MS/MS spektrumları Şekil 30'da gösterilmiştir. YAGFLVEEEE-OH peptitinin [M-H]⁻ iyonun parçalanması sırasında [M-H-E]⁻, [M-H-2E]⁻, [M-H-3E]⁻ ve [M-H-4E]⁻ iyonları oluşmuştur. Bu iyonlara ek olarak b₉⁻, y₈⁻, b₈⁻, b₇⁻, b₆⁻ ve c₄⁻ iyonları çok net bir şekilde saptanmıştır.

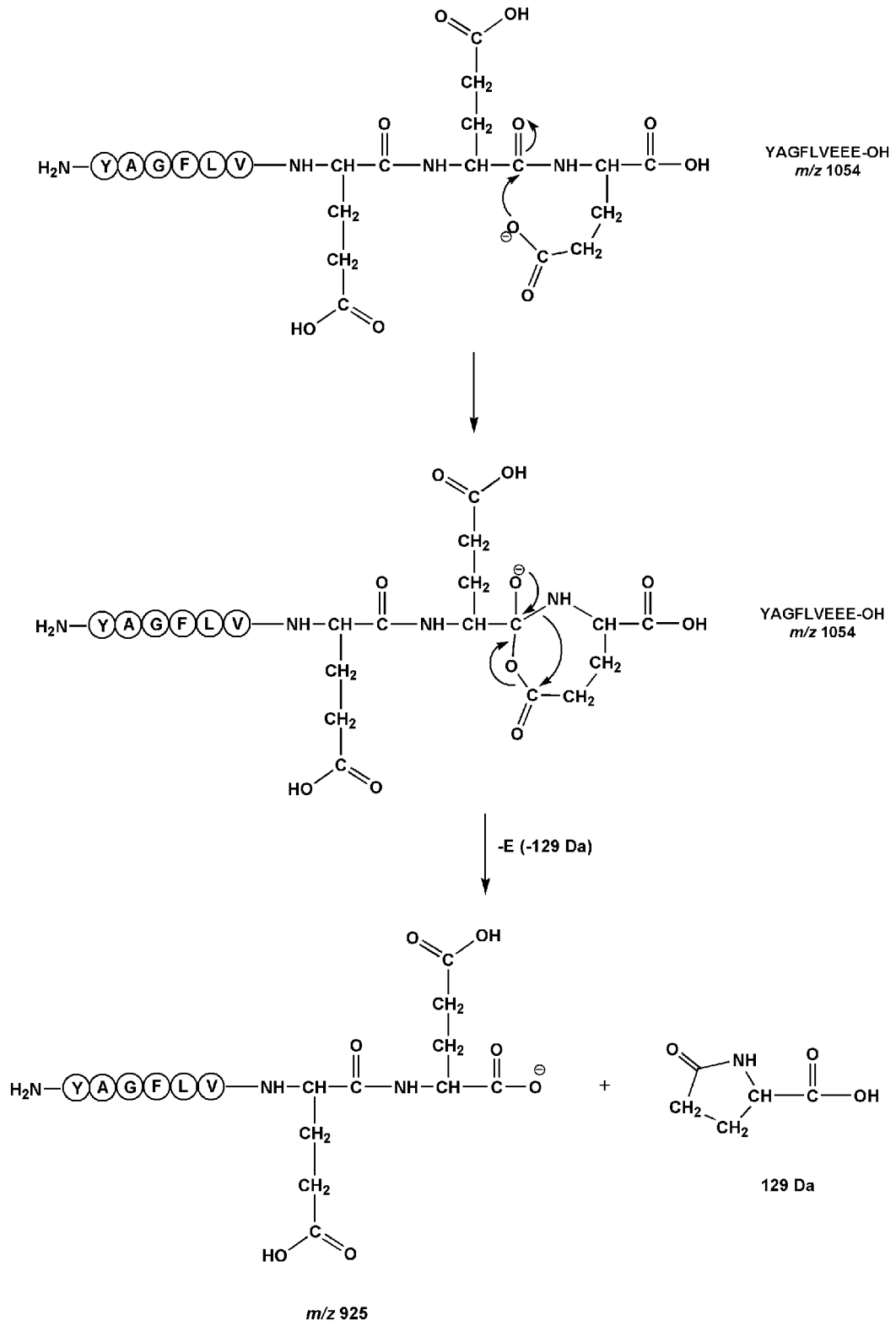
YAGFLVEEEEE-OH peptitinin [M-H]⁻ iyonun parçalanması sırasında ise [M-H-E]⁻, [M-H-2E]⁻, [M-H-3E]⁻, [M-H-4E]⁻ ve [M-H-5E]⁻ iyonları gözlemlenmiştir.. Ayrıca b₁₀⁻, b₉⁻, y₉⁻, b₈⁻, b₇⁻, b₆⁻ ve c₄⁻ iyonları da belirgindir. Glutamik asitli peptit serilerinde peptitin C-ucundan ardışık olarak glutamik asitlerin kopmaları daha önce raporda gösterdiğimiz mekanizmaya göre gerçekleşmektedir.



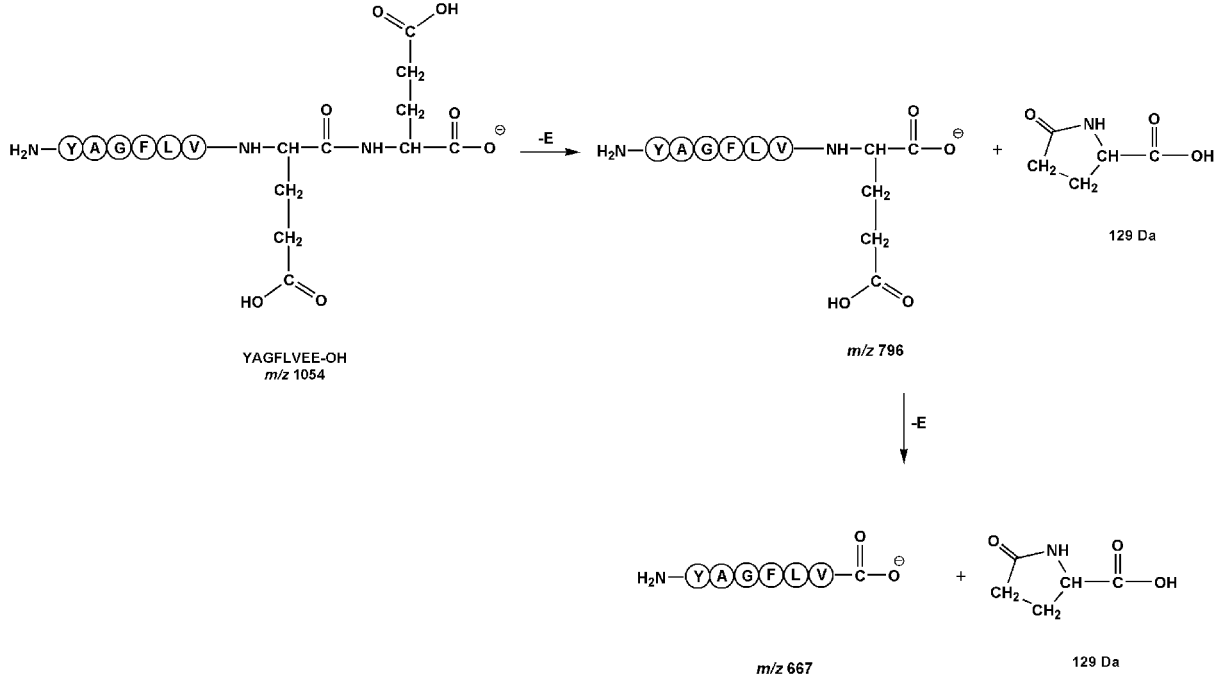
Şekil 30. YAGFLVEEEEE-OH ve YAGFLVEEEEE-OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları



Şekil 31. Ardışık glutamik asit kopma mekanizması



Şekil 32. Ardışık ikinci glutamik asit kopma mekanizması

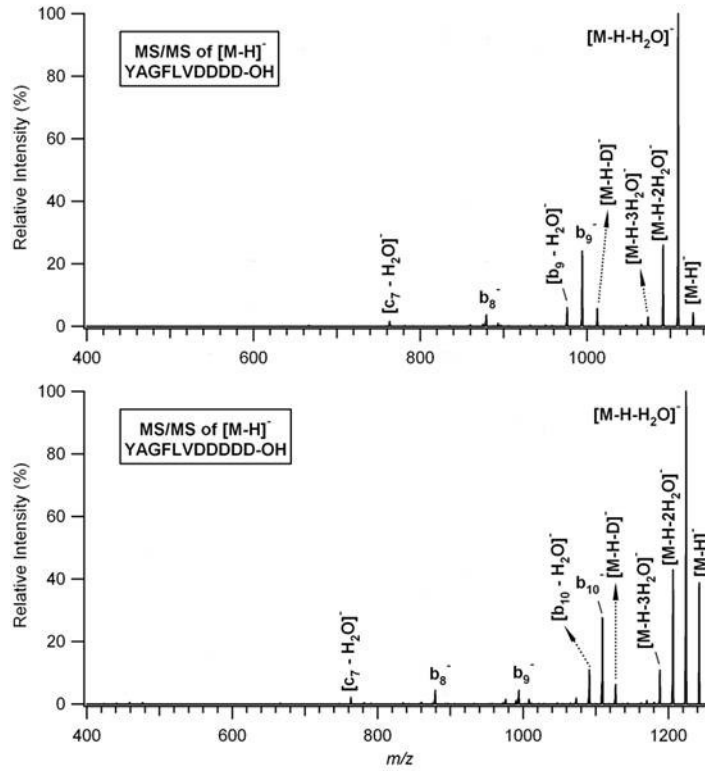


Şekil 33. Ardışık üçüncü glutamik asit kopma mekanizması

Diğer yandan, aspartik asitli peptit serilerinin $[M-H]^-$ iyonları MS/MS spektrumları Şekil 34'da gösterilmiştir.

YAGFLVDDDD-OH peptitinin $[M-H]^-$ iyonun parçalanması sırasında sadece tek aspartik asit kopması ($[M-H-D]^-$) görülmüştür. Glutamik asitli serilerdeki gibi ardışık kopmalar yoktur. Bu durum glutamik ve aspartik asitin yan zincirlerindeki ($-CH_2$) farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca peptit sekansı da bu kopmaların gözlemlenmemesinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu iyon ek olarak b_9^- , b_8^- , $[b_9-H_2O]^-$ ve $[c_7-H_2O]^-$ iyonları saptanmıştır.

YAGFLVDDDD-OH peptitinin $[M-H]^-$ iyonun parçalanması sırasında ise yine sadece tekli aspartik asit kopması saptanmıştır ve diğer ardışık aspartik asit kopmalarının iyon şiddetleri yok denecek kadar azdır. b_{10}^- , $[b_{10}-H_2O]^-$, b_9^- , b_8^- ve $[c_7-H_2O]^-$ iyonları gözlemlenmiştir.

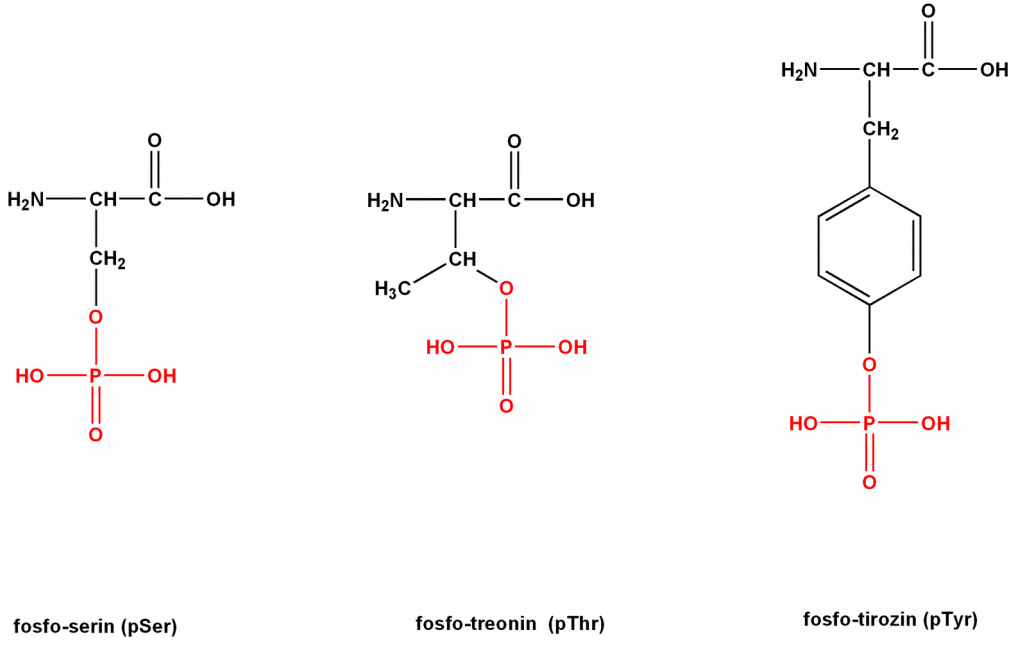


Şekil 34. YAGFLVDDDD–OH ve YAGFLVDDDD–OH peptitlerinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumları

3.4. Fosforlanmış Amino Asit İçeren Peptitlerin Negatif İyonlarının Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

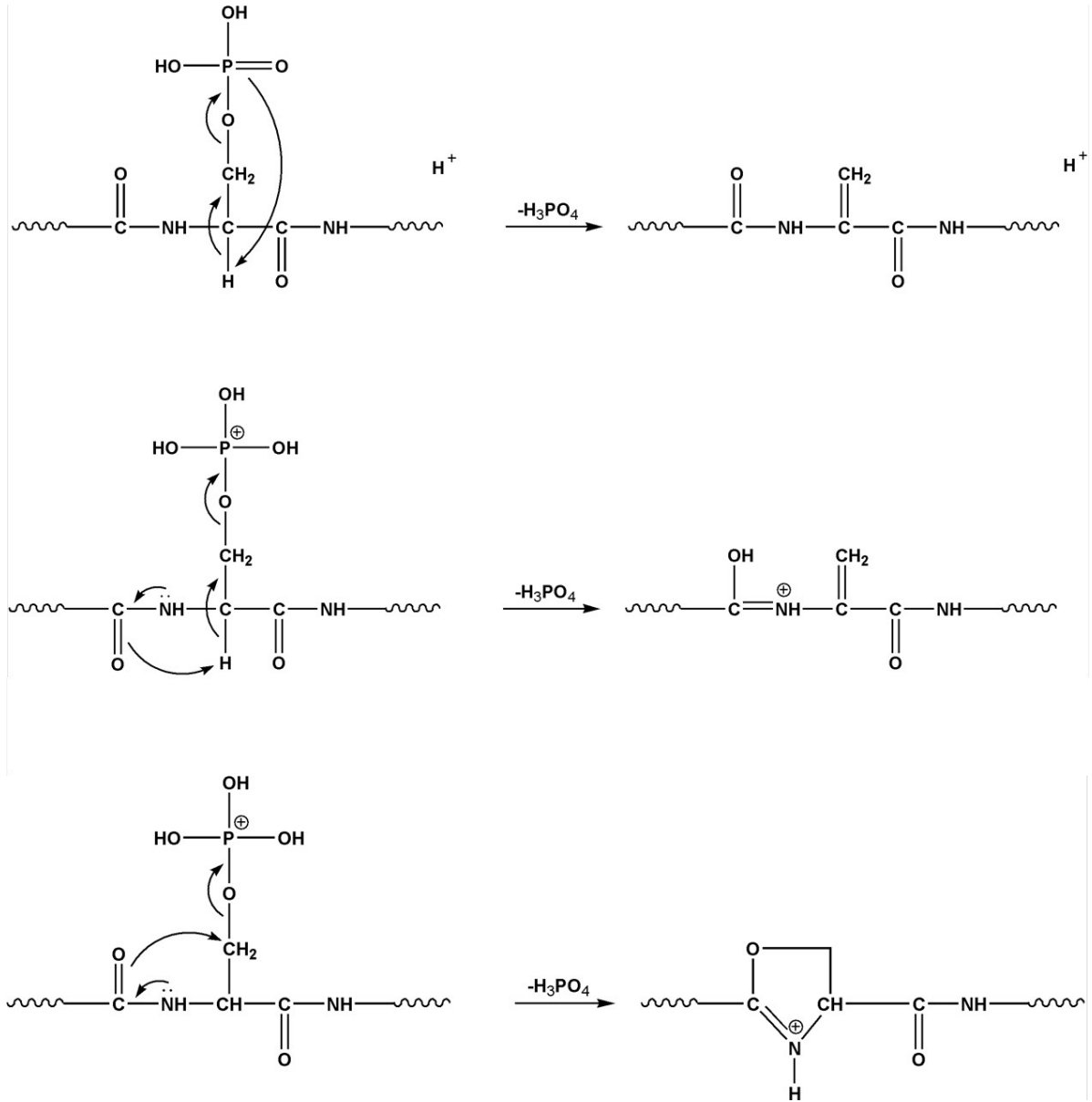
Projenin diğer bir önemli kısmı, fosforlanmış amino asitler içeren model peptitlere ait $[M-H]^-$ iyonunun gaz-fazındaki parçalanma reaksiyonlarının incelenmesi ilgili çalışmalardan oluşmaktadır. Proteinlerin fosforlanması genellikle serine (S), tirozin (Y) ve treonin (T) amino asitleri üzerinde olmaktadır. Modifiye olmuş bu amino asitleri içeren peptitler deneysel bölümdeki Tablo 3'de listelenmiştir.

Fosforlanmış serin, treonin ve tirozin amino asitlerinin yapısı Şekil 35'de gösterilmiştir. Görüleceği üzere fosfor grupları, amino asitlerin yan zincirindeki $-OH$ grubundan bağlanmaktadır.



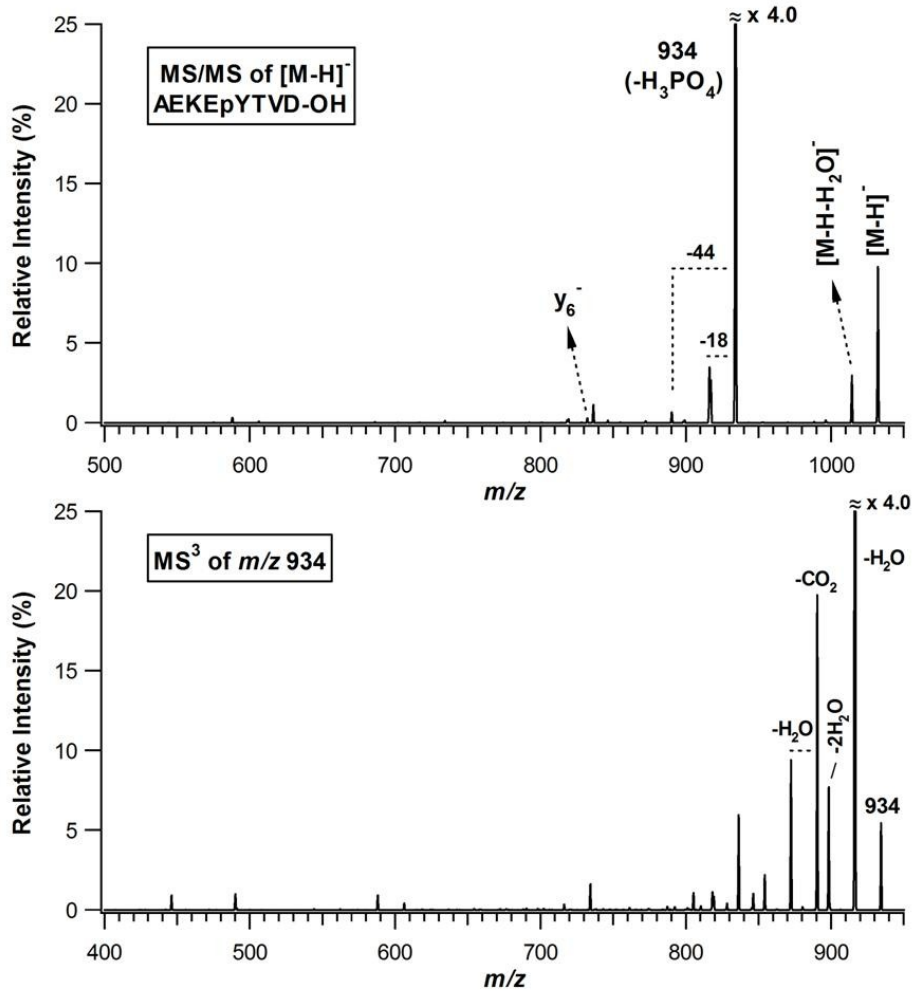
Şekil 35. Fosforlanmış serin, treonin ve tirozin amino asitleri

Genel bir bakışla; pSer, pThr ve pTyr amino asitlerini içeren peptitlerin gaz-fazında CID ile parçalanması sırasında yüksüz 98 Da kopması gözlemlenmiştir ve bu iyonun şiddeti kütle spektrumunda görülen en yüksek değerdedir. Bu amino asitlerden fosforik asit kopmasının (-98 Da) mekanizmaları da Şekil 36'da gösterilmiştir.



Şekil 36. Fosforik asit kopma mekanizması

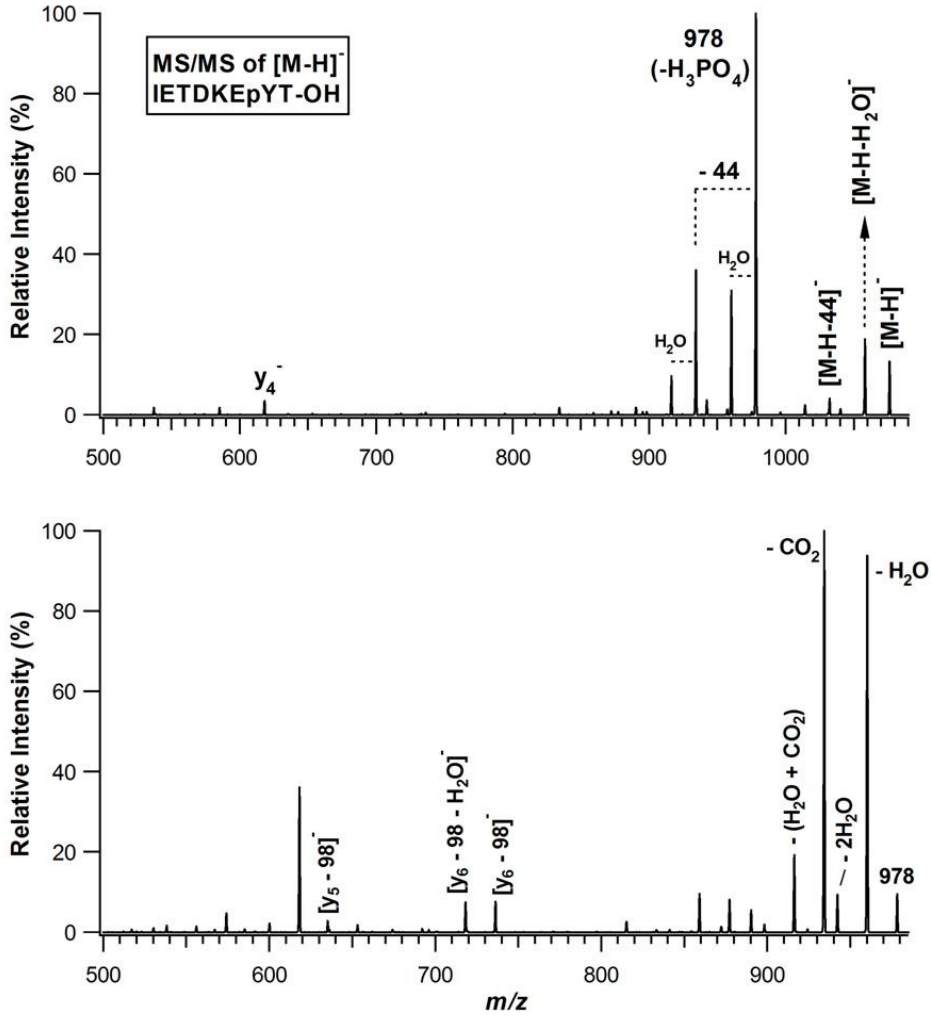
AEKEpYTVD-OH peptitinin $[\text{M}-\text{H}]^-$ iyonunun (m/z 1032) MS/MS kütle spektrumunda fosforik asit (H_3PO_4) kopması (-98 Da, m/z 934) gözlemlenmiştir (Şekil 37). Bu peptitte fosforlanma trizon amino asiti (pTyr) üzerindedir ve peptitin N-ucu tarafından beşinci sırasındadır. Bu iyonu ek olarak düşük iyon şiddetine sahip olsalarda $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ iyonu da kütle spektrumunda mevcuttur.



Şekil 37. AEKEpYTVD-OH peptidinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumu

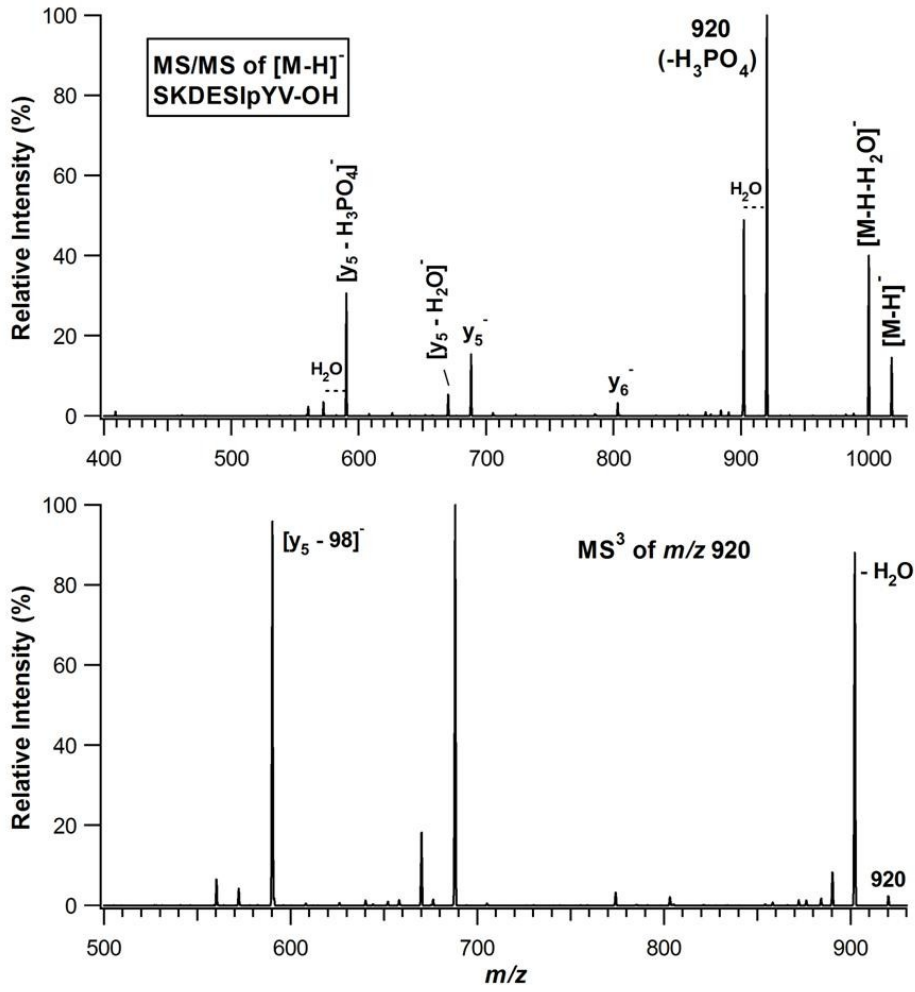
İkinci peptitte ise yine fosforlanmış tirozin (pTyr) amino asiti bulunmaktadır ve bu modifiye olmuş amino asit peptidin C-ucu tarafında yakındır. Bu peptidin [M-H]⁻ iyonunun (*m/z* 1076) MS/MS kütle spektrumu Şekil 38'de gösterilmiştir.

Beklenildiği üzere yine fosforik asit kopması (-98 Da, *m/z* 978) en yüksek iyon şiddetine sahiptir. Diğer yandan, fosforik asit koptuktan sonra su kopması (-18 Da), -44 Da kopması ve tekrardan su kopması (-18 Da) mevcuttur. Ayrıca y₄⁻ iyonu da kütle spektrumunda görülmüştür. Fosforlanmış tirozin peptidin C-ucu tarafına ilerledikçe spektrum bir önceki peptite göre karışık hale gelmektedir.



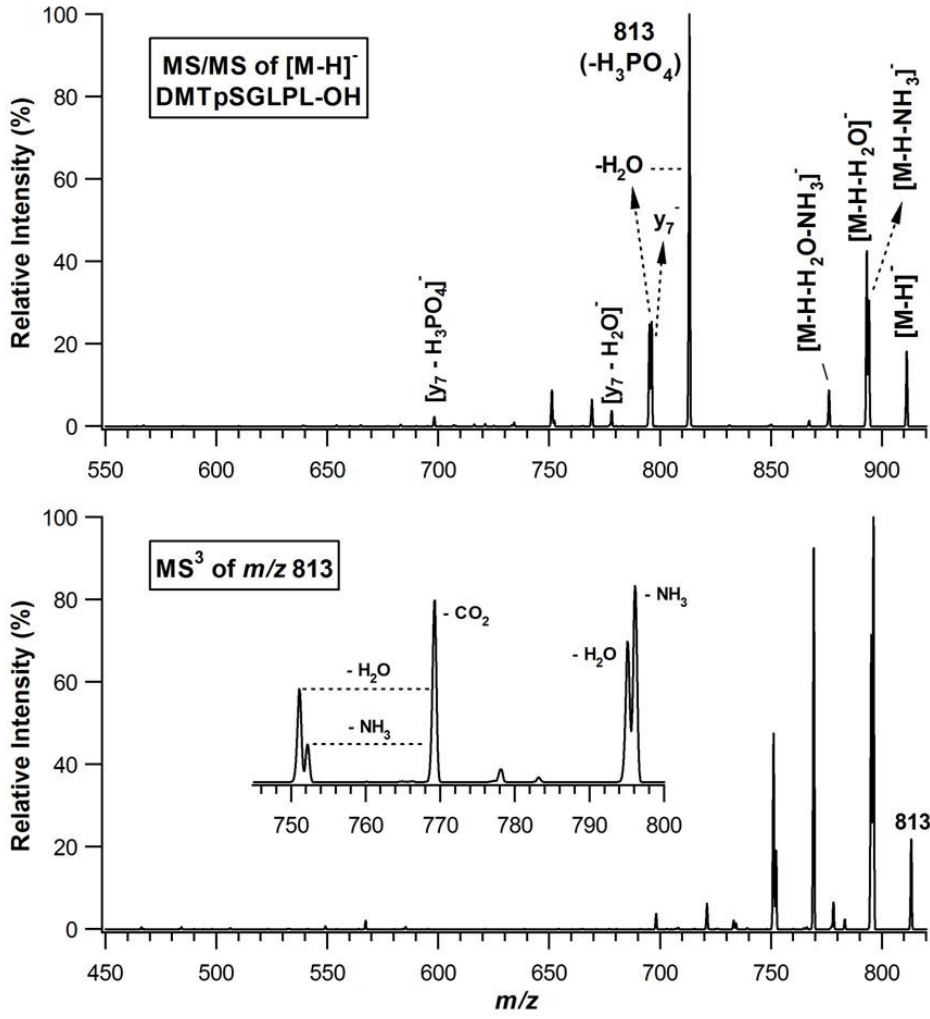
Şekil 38. IETDKEpYT-OH peptitinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumu

Yine fosforlanmış tirozin içeren SKDESlpYV-OH peptidin $[M-H]^-$ iyonunun (m/z 1018) MS/MS kütle spektrumu Şekil 39'de verilmiştir. $[M-H]^-$ iyonundan $-H_3PO_4$ kopması (-98 Da, m/z 920) iyonu en yüksek iyon şiddetine sahiptir. İlginç bir şekilde, y_5^- iyonu ve bu iyonun hem su kopması (-18 Da) hem de fosforik asit kopması (-98 Da) gözlemlenmiştir. Yukarıdaki peptitte olduğu gibi pTyr peptidin C-ucu tarafına yakındır ve bu durum kütle spektrumundaki iyon sayısını arttırmaktadır.



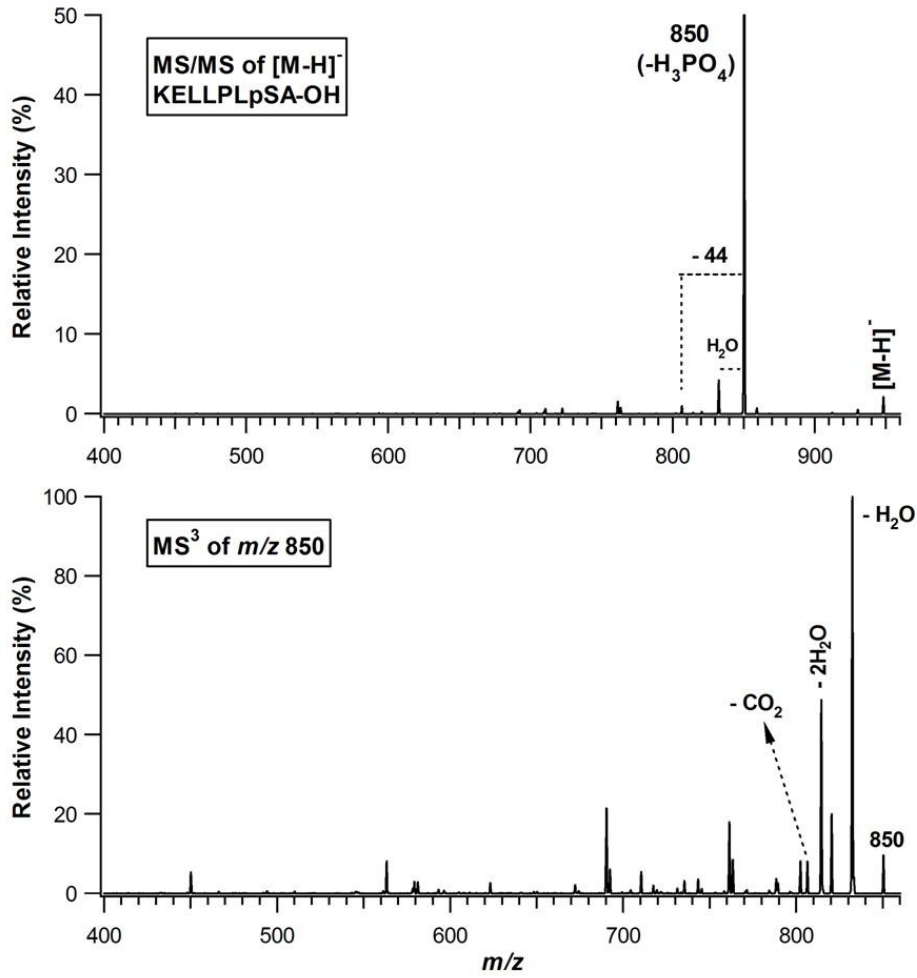
Şekil 39. SKDESIpYV-OH peptidinin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumu

Bir diğer fosforlanmış amino asit olan serin (pSer) içeren peptitlerin $[M-H]^-$ iyonlarına ait kütle spektrumları aşağıda gösterilmiştir. DMTpSGLPL-OH peptidinin $[M-H]^-$ iyonuna (m/z 911) ait MS/MS spektrumunda (Şekil 40) fosforik asit kopması (-98 Da, m/z 813) iyonu yine en yüksek şiddettedir. Bu iyonun ek olarak $[M-H-H_2O]^-$ ve $[M-H-NH_3]^-$ kopmaları da mevcuttur ve iyon şiddetleri oldukça belirgindir. Diğer yandan, y_7^- iyonu ve bu iyonun hem su (-18 Da) hem de $-H_3PO_4$ kopmaları (-98 Da, m/z 698) gözlemlenmiştir.



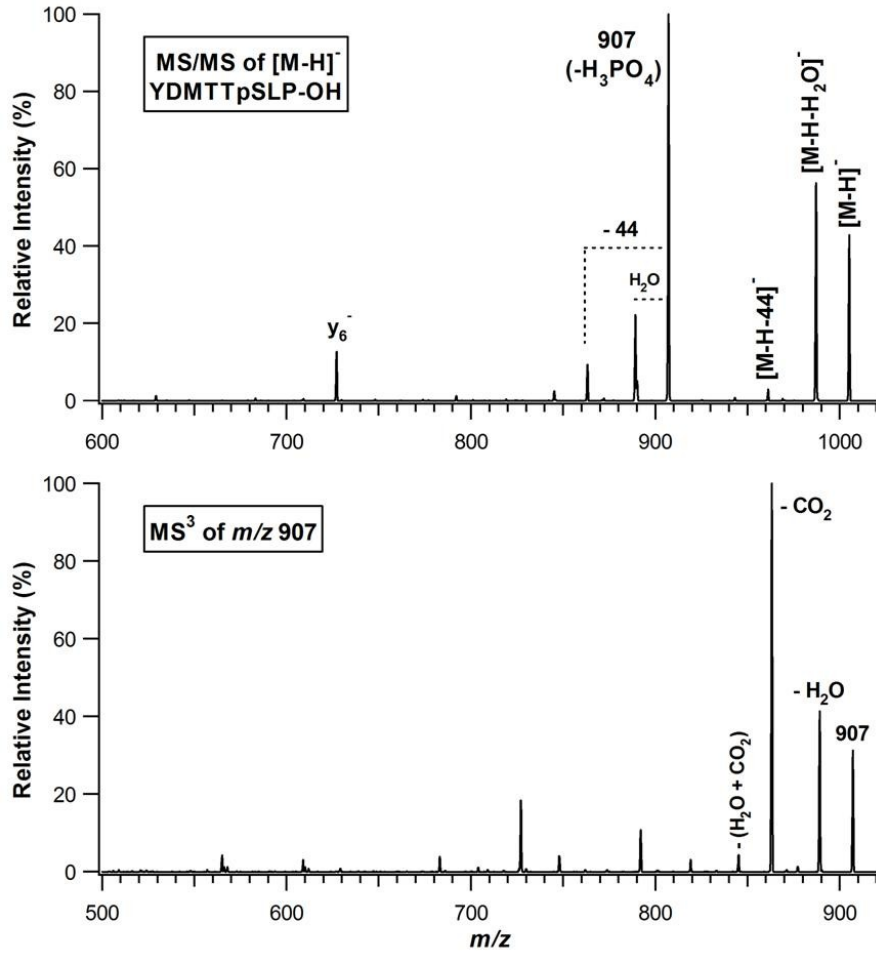
Şekil 40. DMTpSGLPL-OH peptininin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumu

Fosforlanmış serin içeren bir diğer peptit ise KELLPLpSA-OH'dır ve bu peptitin [M-H]⁻ iyonuna (m/z 948) ait kütle spektrumları Şekil 41'da verilmiştir. Bu kütle spektrumu bir önceki pSer içeren peptite göre daha az parçalanma ürünü içermektedir. Yine [M-H]⁻ iyonundan -H₃PO₄ (-98 Da, m/z 850) kopması en yüksek iyon şiddetine sahiptir. Bu iyondan hem su (-18 Da) hem de -44 Da kopmaları mevcuttur.



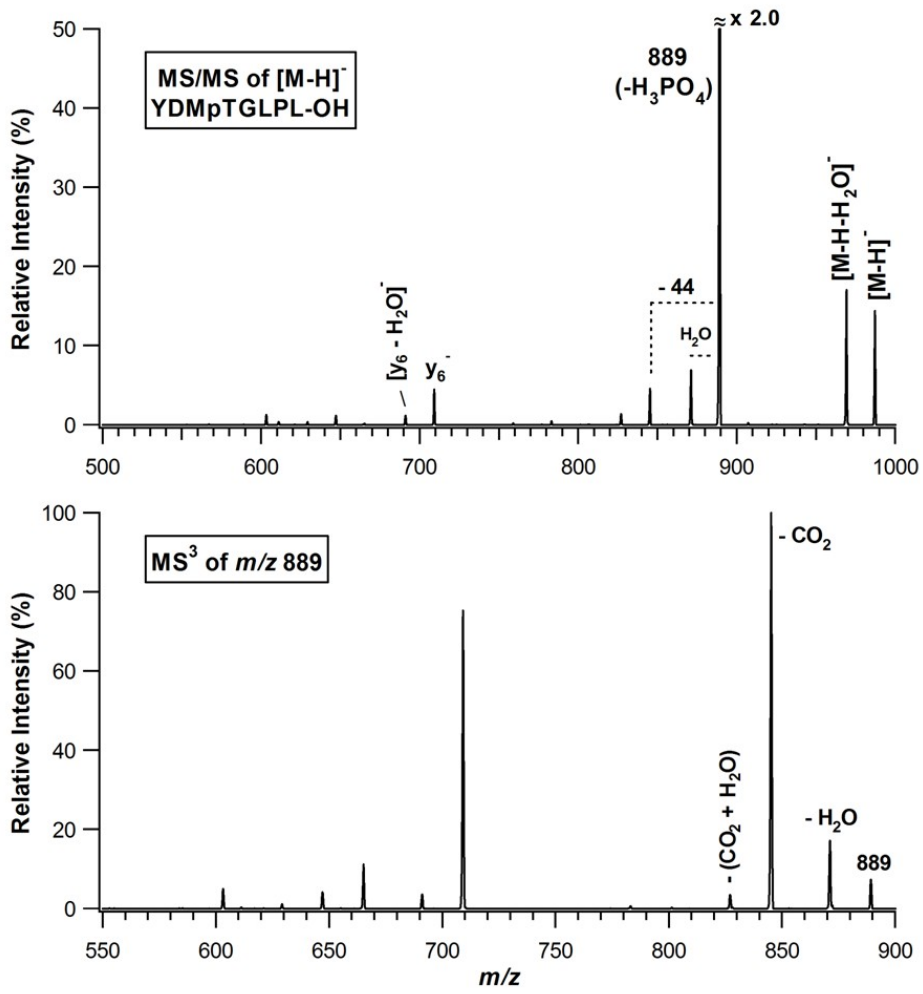
Şekil 41. KELLPLpSA-OH peptidinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumu

Fosforlanmış serin içeren bir diğer peptit ise YDMTTpSLP-OH'dır. Bu peptidin [M-H]⁻ iyonu (m/z 1005) MS/MS kütle spektrumu Şekil 42'de gösterilmiştir. m/z 907 (fosforik asit kopması, -98 Da) en yüksek iyon şiddetine sahiptir ve bu iyondan hem su (-18 Da) hem de -44 Da kopmaları mevcuttur. Ayrıca [M-H-H₂O]⁻ (m/z 987) iyonunun şiddeti de yüksektir. Bu iyonlara ek olarak y_6^- iyonu da gözlemlenmiştir.



Şekil 42. YDMTTpSLP-OH peptidinin [M-H]⁻ iyonu MS/MS spektrumu

Son olarak fosforlanmış treonin içeren YDMpTGLPL-OH peptidine ait [M-H]⁻ iyonunun (*m/z* 987) MS/MS spektrumu alınmıştır ve Şekil 43'de gösterilmiştir. [M-H]⁻ iyonundan su (-18 Da, *m/z* 969) ve -H₃PO₄ kopmaları (-98 Da, *m/z* 889) kütle spektrumunda baskındır. Diğer yandan, y₆⁻ ve [y₆ - H₂O]⁻ iyonları da kütle spektrumunda mevcuttur.



Şekil 43. YDMpTGLPL-OH peptininin $[M-H]^-$ iyonu MS/MS spektrumu

4. BÖLÜM

SONUÇLAR

Literatürde, bildiğimiz kadarı ile, bu kadar detaylı negatif iyon çalışması yapılmamıştır. Ayrıca belirtmek isteriz ki bu kadar büyüklükte ve çeşitlikte olan model peptitler ile çalışma yapan grub yok diyebiliriz. Negatif iyon çalışması yapan önemli gruplardan birisi olan Prof. Cassidy ile birlikte ardaşık glutamik kopma mekanizması ile ilgili makale tarafımdan birlikte yayınlanmıştır. O çalışmada gözleyemediğimiz tekli aspartik asit elenmesi, bu proje kapsamında gözlemlenmiştir ve literatürden farklı olarak gözlediğimiz önemli bir sonuçtur. Ayrıca, C-ucunda çoklu aspartik asit bulduran peptit serisinde, zayıfda olsa ardaşık aspartik asit kopmaları gözlemlenmiştir.

Proton kopartılmış peptitler ile yapılan sistematik çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde, asidik amino asidin pozisyonunun gaz fazı parçalanma mekanizmasına etkisi açıkça görülmektedir. Birden fazla asidik amino asit içeren peptit türevlerinin parçalanma mekanizmalarında, amino asidin sekansdaki pozisyonuna göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Amino asit sekansı, EA₆-OH ve EA₆-NH₂ peptitlerin MS/MS spektrumları karşılaştırıldığında (Şekil 5), en güçlü sinyal olarak su kopması her iki peptit türevi içinde gözlenmiştir. Bunun yanında, C-ucunda -OH ihtiva eden peptit türevinde, y_n⁻ (n= 3-6) iyonlarının yanı sıra [c_n - H₂O]⁻ (n=2-4) ve [c_n - NH₃]⁻ (n=4-6) iyonları gözlenmiştir. C-ucunda -NH₂ grubu ihtiva eden peptit türevinde, [c_n - NH₃]⁻ (n=4-6) sinyalleri gözlenmemiştir. Fakat [c_n - H₂O]⁻ (n=2-5) iyonları MS/MS kütle spektrumunda gözlenmiştir. Düşük iyon şiddetinde y_n⁻ (n=3-6) iyonları da gözlenmektedir.

Benzer bir şekilde ise, A₃EA₃-OH ve A₃EA₃-NH₂ sekanslı peptit türevlerini MS/MS kütle spektrumları karşılaştırıldığında, C-ucunda -OH bulduran peptit türevinde diğer kütle sinyallerine göre sinyal şiddeti güçlü [c_n - NH₃]⁻ (n=4-6) iyonları gözlenmiştir. Ayrıca ana iyondan tekli ve ikili amino asit kopmaları da gözlenmiştir. Bunlara ek olarak y_n⁻ (n=3-6) iyonlarının yanı sıra değişik şiddette bilgi veren iyonlarda gözlenmiştir. Buna karşılık C-ucunda -NH₂ bulduran peptit türevinde [c_n - NH₃]⁻ (n=4-6) iyonları gözlenmemiştir. Buna karşılık, [y_n - H₂O]⁻ (n=4, 5) ve y_n⁻ (n=3-5) iyonları gözlenmiştir. Ayrıca her iki peptit türevi için ana iyondan su kopmaları gözlenmiştir.

A₆E-OH ve A₆-NH₂ peptit türevlerinin MS/MS kütle sinyalleri karşılaştırıldığında, C-ucunda -OH bulunan peptit türevinde y_n⁻ (n= 3-6) iyonları ile c_n⁻ (n=3,4), b_n⁻ (n= 5,6) iyonları gözlenmiştir. Bunların yanında, ana iyondan tekli ve/veya çoklu amino asit kopmalarında gözlenmiştir. C-ucunda -NH₂ bulduran peptit türevinde ise iyon sinyali şiddetli c_n⁻ (n=3-6) iyonları ile [y_n - H₂O]⁻ (n=2-6) ve y_n⁻ (n=2-6) iyonları gözlenmiştir.

AEAAAAA-OH ve AEAAAAA-NH₂ peptit türevlerinin MS/MS kütle spektrumlarında c_n⁻ (n=4,5) C-ucunda –OH bulunan peptit türevi için gözlenirken –NH₂ bulunan peptit türevi için herhangi bir c-iyon türü gözlenmemiştir. Bunun yanında her iki peptit türevinde de c-iyon türünden H₂O ve NH₃ kopmaları gözlemlenmiştir. Ayrıca y-türü iyon sinyalleri ve bu iyondan H₂O kopmaları da düşük sinyal şiddetinde gözlenmiştir. AAEEAAA-OH ve AAEEAAA-NH₂ peptit türevlerinin MS/MS kütle spektrumlarında, her iki peptit türevi içinde c-iyon türü ve bu iyonlardan H₂O kopmaları gözlenmiştir. C-ucunda –OH bulunan peptit türevi için ayrıca c-iyon türünden NH₃ kopmaları da gözlenmiştir. Her iki peptit türevinde y-iyon türü gözlenmiştir. Sinyal şiddeti genelde düşük seviye gözlenmektedir. AAAAEAA-OH ve AAAAEAA-NH₂ peptit türevlerinin MS/MS kütle spektrumlarında, c-iyon türleri her iki peptit türevi içinde gözlenmiştir. C-ucunda –OH bulunan peptit türevinde c-iyon türünden NH₃ kopmaları gözlemlenirken, –NH₂ bulunan peptit türevinden sadece su kopması gözlenmiştir. Bunu yanında, C-ucunda –OH bulunan peptit türevinde y-iyon türleri gözlenirken, –NH₂ bulunan peptit türevinde y-iyon türünden H₂O kopmaları daha fazladır. Çoğunlukla düşük şiddette iyon sinyalleri gözlenmektedir. AAAAEA-OH ve AAAAEA-NH₂ peptit türevlerinin MS/MS kütle spektrumlarında, c-iyon türleri, y-iyon türleri her iki peptit türevinde de gözlenmektedir. Fakat, C-ucunda –OH bulunduran peptit türevinden, herhangi bir H₂O veya NH₃ kopması gözlenmezken, C-ucunda –NH₂ bulunduran peptit türevinde, c-iyon türünden H₂O ve NH₃ kopmaları gözlenmektedir. Ayrıca, y-iyon türünden de H₂O kopması gözlenmiştir.

XYAGFLV-OH, YXAGFLV-OH, YAXGFLV-OH, YAGXFLV-OH, YAGFXLV-OH, YAGFLXV-OH ve YAGFLVX-OH (X=E veya D) peptit türevleri ile yapılan çalışmalarda, sekansında glutamik asit, E, bulunan peptit türevinden elde edilen MS/MS kütle spektrumları, sekansında aspartik asit, D, bulunan peptit türevine göre daha fazla sinyal göstermektedir. Genel olarak b_n⁻, y_n⁻ ve c_n⁻ (n=3 veya 5 veya 6) iyonlar her iki peptit türevi içinde gözlenmektedir. İyonlar değişik oranda ve şiddette asidik amino asitin pozisyonuna göre değişmektedir. Fakat mutlaka biri veya ikisi veya hepsi MS/MS kütle spektrumlarında gözlenmektedir. Asidik amino asit, C-ucuna yaklaşırken iyon şiddetlerinde ve çeşitliliğinde artmalar glutamik asitde, E, aspartik aside göre, D, daha fazla gözlenmektedir. Bununda glutamik asidin yan zincirinde bulunan fazladan –CH₂ grubundan kaynaklanıyor olması muhtemeldir. Sekansında çoklu asidik amino asit bulunduran (XXYAGFLV-OH, YXXAGFLV-OH, YAXXGFLV-OH, YAGXXFLV-OH, YAGFXXLV-OH, YAGFLXXV-OH, YAGFLVXX-OH, (X=Glutamik Asit, E, veya Aspartik Asi D) VE XXXYAGFLV-OH, YXXXAGFLV-OH, YAXXXGFLV-OH, YAGXXXFLV-OH, YAGFXXXLV-OH, YAGFLXXXV-OH, YAGFLVXXX-OH, (X=Glutamik Asit, E, veya Aspartik Asi D) peptit türevleri ile yapılan sistematik çalışmada MS/MS kütle spektrumlarında y_n⁻ ve b_n⁻ (n=3 veya 4 veya 5 veya 6 veya 7) iyonları her iki peptit türevi içinde gözlenmektedir. İyonlar değişik oranda ve şiddette asidik amino asitin

pozisyonuna göre değişebilmektedir. Fakat mutlaka biri veya ikisi veya hepsi MS/MS kütle spektrumlarında gözlenmektedir. Bunlara ek olarak bu iyonların bazılarında H₂O ve/veya NH₃ kopmalarıda gözlenmektedir. Su kopmaları her zamanki gibi en siddetli kopmalar olarak her iki peptit türevi için gözlenmektedir. Asidik amino asit C-ucuna geldiğinde, ana iyonda glutamik asit kopması en yüksek iyon şiddeti göstermektedir. Aynı gözlem aspartik asit için gözlenmemektedir. Düşük şiddetli bir kopma gözlenmektedir. İkili glutamik asit içeren peptit türevinden ardaşık glutamik asit, E, kopması gözlemlenirken aynı davranış aspartik asit, D, için gözlenmemiştir. Buna ek olarak, YAGFLVEEEE-OH peptit türevinden ardaşık glutamik asit, E, eliminasyonu gözlenirken, YAGFLVDDD-OH peptit türevinden tek bir aspartik eliminasyonu gözlemlenmektedir. Ayrıca birinci peptit türevinin MS/MS kütle spektrumunda (Glutamik ihtiva eden), b_n^- (n=5-7), c_4^- ve y_7^- iyon türleride gözlemlenirken, aspartik, D, asit ihtiva eden peptit türevinde sadece $[c_7 - H_2O]^-$ ve b_8^- iyon türleri gözlenmiştir. Her iki peptit türünde de ana iyondan H₂O kopmaları gözlenmiştir. YAGFLVEEEE-OH ve YAGFLVEEEEE-OH peptit türevlerinin MS/MS kütle spektrumlarında, ardaşık dördü ve bir sonraki peptit içinse ardaşık beşli glutamik asit kopmaları gözlenmiştir. Her iki peptit türü için b_n^- (n=6 to 9 veya 10) iyonları gözlenmiştir. Bunlara ek olarak c_4^- iyonu ve y_n^- (n=8 veya 9) ve $[y_n - H_2O]^-$ (n=4 ve/veya 5) iyonlarıda gözlenmiştir. Görüleceği üzere glutamik asit'in yan zincirinde bulunan bir fazla -CH₂ grubu ardaşık glutamik asit kopmalarının gözlenmesine sebep olmakta ve mekanizması ise glutamik asit'in, kararlı beş halkalı pyroglutamate olarak ayrılması ile açıklanmaktadır. Aynı kararlı halkalı yapının yan zincirinde bir -CH₂ grubu eksik olan aspartik asit amino asitinde yapılamamasından dolayı düşük şiddette tekli aspartik asit kopması gözlenmektedir.

AEKEpYTV-D-OH, IETDKEpYT-OH, SKDESpYV-OH, DMTpSGLPL-OH, KELLPLpSA-OH, YDMTTpSLP-OH, ve YDMpTGLPL-OH fosforlanmış peptit türevlerinin MS/MS kütle spektrumlarının hepsinde ana iyondan H₃PO₄ (Molekül ağırlığı: 98) kopması en şiddetli iyon olarak gözlenmektedir. Bunun yanında bazı peptit türevlerinde orta şiddete veya zayıf ana iyondan H₂O kopması, y -türü iyonlar, 44 kopmalarıda gözlenmiştir. Fakat fosforlanmış amino asidin pozisyonunu belirtecek herhangi bir informatik bilgi elde edilememiştir. Sadece peptit türevinin fosforlanmış olduğunu gösteren -H₃PO₄ kopması dışında informatik bir bilgi elde edilememiştir. Bunu yanında -H₃PO₄ kopmasından sonra her bir iyon tek tek iole edilmiş ve bütün bu iyonların MS/MS/MS çalışmaları yapılmıştır. Hemen hemen hepsinde H₂O ve CO₂ kopmaları sonucunda oluşan iyonlar ana iyonlar olarak gözlenmiştir. Bunu dışında gözlemlenen düşük veya orta şiddetteki iyon türleride fosforlanmış amino asitin pozisyonu hakkında informatik bilgiler vermemiştir.

Asidik peptitler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler yeni informatik bilgiler taşımaktadır. Özellikle glutamik asit ihtiva eden peptitlerde gözlemlenen ardaşık peptit

eliminasyonları en önemli bir gözlemdir. Bunu yanında asidik peptitlerin C-ucuna yaklaştıkça kütle sinyallerinin daha belirginleşmesi ve iyon türlerinin daha artması ve çeşitlenmesi gene önemli bir gözlemdir.

Fosforlanmış peptitler ile bu güne kadar yapılan çalışmalarda elde edilen bir çok sonuç aşağı yukarı bizim gözlemlerimizin benzerleridir. Bu çalışma sonunda elde ettiğimiz önemli çıktılardan birisi, negatif kütle spektrometre çalışması ile fosforlu peptitler tanımlandıktan sonra pozitif kütle spektrometresi kullanılarak (her ne kadar iyon sinyalleri negatif iyon sinyallerine göre çok zayıf olmasada) elde edilecek sonuçlar birleştirilerek daha verimli informatik bilgiler elde edilebilir. Bu sayede fosforlanmış peptit türevlerindeki fosforlanmış amino asidin hangisi olduğu ve hangi pozisyonda bulunduğu hakkında detaylı bilgiler elde edilebilir. Bu çalışma kapsamında fosforlanmış peptitlerin bazıları ile yaptığımız ön çalışmalar, pozitif iyon çalışmaları ile, fosforlanmanın yeri hakkında daha detaylı bilgi edinilmektedir. Bu sonuç kapsamında, TÜBİTAK projesi hazırlayıp, detaylı çalışma düşünülmektedir. Bu çalışmanın en önemli çıktılarından biriside bu kabul edilebilir.

Kaynaklar Listesi

Aebersold, R., Goodlett, D. R. 2001. "Mass Spectrometry in Proteomics" *Chemical Reviews*, 101, 269-295.

Ambihapathy, K., Yalcin, T., Leung, H., Harrison, A. G. 1997. "Pathways to Immonium Ions in the Fragmentation of Protonated Peptides", *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 209-215.

Biemann, K. 1988. "Contributions of Mass Spectrometry to Peptide and Protein Structure", *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, 16, 99-111.

Bleiholder, C., Osburn, S., Williams, T. D., Suhai, S., Van Stipdonk, M., Harrison, A. G., Paizs, B. 2008. "Sequence-Scrambling Pathways of Protonated Peptides", *Journal of American Chemical Society*, 130, 17774-17789.

Bythell, B. J., Maître, P., Paizs, B. 2010. "Cyclization and Rearrangement Reactions of a_n Fragment Ions of Protonated Peptides", *Journal of American Chemical Society*, 132, 14766-14779

Cordero, M. M., Houser, J. J., Wesdemiotis, C. 1993. "The Neutral Products Formed During Backbone Cleavage of Protonated Peptides in Tandem Mass Spectrometry", *Analytical Chemistry*, 65, 1594-1601.

Cox, K. A., Gaskell, S. J., Morris, M., Whiting, A. 1996. "Role of the Site of Protonation in the Low-Energy Decompositions of Gas-Phase Peptide Ions", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 7, 522-531.

Farrugia, J. M., O'Hair, R. A. J., Reid, G. A. 2001. "Ab Initio Studies on Protonated N-Acyl Amino Acid Methyl Ester Model Systems", *International Journal of Mass Spectrometry*, 210-211, 71-87.

Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. 1989. "Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Large Molecules", *Science*, 246, 64-71.

Gonzales, J., Beseda, V., Garay, H., Reyes, O., Padron, G., Tambara, Y., Takao, T., Shimonishi, Y. 1996. "Effect of the Position of a Basic Amino Acid on C-terminal

Rearrangement of Protonated Peptides Upon Collision-Induced Dissociation”, *Journal of Mass Spectrometry*, 31, 150-158.

Guo, Y., Cao, S., Wei, D., Zong, X., Yuan, X., Tang, M., Zhao, Y. 2009. Fragmentation of Deprotonated Cyclic Dipeptides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry”, *Journal of Mass Spectrometry*, 44, 1188-1194.

Harrison, A. G. 2002. “Effect of Phenylalanine on the Fragmentation of Deprotonated Peptides”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13, 1242-1249.

Harrison, A. G., Young, A. B. 2004. “Fragmentation of Deprotonated N-benzoylpeptides: Formation of Deprotonated Oxazolones”, *International Journal of Mass Spectrometry*, 14, 446-456.

Harrison, A. G., Young, A. B., Bleiholder, C., Suhai, S., Paizs, B. 2006. “Scrambling of Sequence Information in Collision-Induced Dissociation of Peptides”, *Journal of American Chemical Society*, 128, 10364-10365.

Harrison, A.G. 2008. “Peptide Sequence Scrambling Through Cyclization of b_5 Ions”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1776-1780.

Harrison, A. G. 2009. “To b or Not to b: The Ongoing Saga of Peptide b Ions”, *Mass Spectrometry Reviews*, 28, 640-654.

Li, Z., Yalcin, T., Casady, C.J. 2006. “C-terminal Amino Acid Residue Loss for Deprotonated Peptide Ions Containing Glutamic Acid, Aspartic Acid, or Serine Residues at the C-terminus”, *Journal of Mass Spectrometry*, 41, 939-949.

Mann, M., Højrup, P., Roepstorff, P. 1993. “Use of Mass Spectrometric Molecular Weight Information to Identify Proteins in Sequence Databases”, *Biological Mass Spectrometry*, 22, 338-345.

McLuckey, S. A. 1992. “Principles of Collisional Activation in Analytical Mass Spectrometry”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 3, 599-614.

Mueller, D. R., Eckersley, M., Richter, W. 1988. “Hydrogen Transfer Reactions in the Formation of “Y+2” Sequence Ions from Protonated Peptides”, *Organic Mass Spectrometry*, 23, 217-222.

Paizs, B., Lendvay, G., Vekey, K., Suhai, S. 1999. “Formation of b_2^+ Ions from Protonated Peptides: An ab initio Study”, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 13, 525-533.

Paizs, B., Suhai, S. 2005. “Fragmentation Pathways of Protonated Peptides”, *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 508-548.

Polce, M. J., Ren, D., Wesdemiotis, C. 2000. “Dissociation of the Peptide Bond in Protonated Peptides”, *Journal of Mass Spectrometry*, 35, 1391-1398.

Pu, D., Cassady, C. J. 2008. “Negative Ion Dissociation of Peptides Containing Hydroxyl Side Chains”, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 22, 91-100.

Roepstorff, P., Fohlmann, J. 1984. “Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides”, *Biomedical Mass Spectrometry*, 11, 601.

Smith, L. L., Herrmann, K. A., Wysocki, V. H. 2006. "Investigation of Gas Phase Ion Structure for Proline-Containing b_2 Ion", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17, 20-28,

Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T. 1988. "Protein and Polymer Analyses Up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry", *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2, 151-153.

Tsaprailis, G., Somogyi, A., Nikolaev, E. N., Wysocki, V. H. 2000. "Refining the Model for Selective Cleavage at Acidic Residues in Arginine-Containing Protonated Peptides", *International Journal of Mass Spectrometry*, 195/196, 467-479.

Vachet, R. W., Bishop, B. M., Erickson, B. W., Glish, G. L. 1997. "Novel Peptide Dissociation: Gas Phase Intramolecular Rearrangement of Internal Amino Acid Residues", *Journal of American Chemical Society*, 119, 5481-5488.

Wysocki, V. H., Tsaprailis, G., Smith, L. L., Brei, L. A. 2000. "Mobile and Localized Protons: A Framework for Understanding Peptide Dissociation", *Journal of Mass Spectrometry*, 35, 1399-1406.

Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., Harrison, A. G. 1995. "Why Are B Ions Stable Species in Peptide Mass Spectra?", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6, 1165-1174.

Yalcin, T., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., Harrison, A. G. 1996. "The Structure and Fragmentation of B_n ($n \geq 3$) Ions in Peptide Spectra", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 7, 233-242.

Yates, J. R. 3rd., Speicher, S., Griffin, P. R., Hunkapiller, T. 1993. "Peptide Mass Maps-A Highly Informative Approach to Protein Identification", *Analytical Biochemistry*, 214, 397-408.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. TALAT YALÇIN
Proje No:	112T558
Proje Başlığı:	Proton Kopartılmış Peptit Türevlerinin Gaz Fazı Reaksiyon Mekanizmalarının Kütle Spektrometre İle İncelenmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	ALPER ARSLANOĞLU
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/12/2012 - 01/12/2014
Onaylanan Bütçe:	296400.0
Harcanan Bütçe:	269079.69
Öz:	<p>Bu çalışmada, proton kopartılmış peptit türevlerinin gaz fazı reaksiyon mekanizmaları kütle spektrometre yardımı ile çalışılmıştır. Asidik amino asitlerin pozisyon etkileri, komşu amino asidin yan zincirindeki fonksiyonel grupların parçalanma mekanizmalarına etkileri araştırılmıştır.</p> <p>Ayrıca forforlanmış peptitler kullanılarak gaz fazı parçalanma mekanizmaları detaylandırılmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Deprotonated peptide, fosforlanmış peptitler, reaksiyon mekanizması, kütle spektrometresi,
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır