



**Bazik Amino Asit İçeren Çift-Protonlanmış Peptit
İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Mekanizmalarının Kütle
Spektrometresi ile Çalışılması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 215Z257

**Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. TALAT YALÇIN**

**Bursiyerler:
Melike DİNÇ
Begüm Özyağcı**

Ekim 2018
İZMİR



TÜBİTAK **ÖNSÖZ**

TÜBİTAK tarafından 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında desteklenen 215Z257 nolu bu projede, çifte protonlanmış peptit türevlerinin gaz-fazı reaksiyon mekanizmaları kütle spektrometresi (MS) ile detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Bu amaçla, sekanslarında bazik amino asit (Lysine,K, Arginine,R, veya Histidine,H) içeren model peptitlerin $[M+2H]^{2+}$ iyonlarının gaz-fazı parçalanma mekanizmaları ve detaylı bir şekilde çalışılmıştır.

Proje ekibi TÜBİTAK'a maddi katkılarından dolayı teşekkür eder.

ÖNSÖZ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
GİRİŞ.....	1
1.1. Kütle Spektrometresi ile Peptitlerin Sekanslarının Bulunması	1
1.2. Literatür Özeti.....	4
1.3. Projenin Amacı	8
DENEYSEL YÖNTEM.....	10
BULGULAR VE TARTIŞMA.....	11
3.1 AAAAAA-NH ₂ ve Bir Adet Hisitidin,H, Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	11
3.2 AAAAAA-NH ₂ ve Bir Lizin,K, Bazik Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	15
3.3 AAAAAA-NH ₂ ve Bir Arjinin,R, Bazik Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	20
3.4 YAGFLV-NH ₂ ve Bir Bazik Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	23
3.4.1 YAGFLV-NH ₂ ve Hisitidie Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	23
3.4.2 YAGFLV-NH ₂ ve Lizin,K, Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	28
3.4.3 YAGFLV-NH ₂ ve Arjinin,R, Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	33
3.5 Çifte Protonlanmış HXXXXXX-NH ₂ , XXXHXXX-NH ₂ , XXXXXXH-NH ₂ (X=C, F, G, L, M, V, Y, S, T) Hepta Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonları.....	38
3.5.1 Çifte Protonlanmış HCCCCC-NH ₂ , CCCHCC-NH ₂ , ve CCCCCCH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	38



3.5.2	Çifte Protonlanmış HFFFFFF-NH ₂ , FFFHFFF-NH ₂ , ve FFFFFFFH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	40
3.5.3	Çifte Protonlanmış HGGGGGG-NH ₂ , GGGHGGG-NH ₂ , ve GGGGGGH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	42
3.5.4	Çifte Protonlanmış HLLLLLL-NH ₂ , LLLHLLL-NH ₂ , ve LLLLLLH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	44
3.5.6	Çifte Protonlanmış HMMMMMM-NH ₂ , MMMHMMM-NH ₂ , ve MMMMMMH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	46
3.5.7	Çifte Protonlanmış HVVVVV-NH ₂ , VVVHVV-NH ₂ , ve VVVVVH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	48
3.5.8	Çifte Protonlanmış HYYYYYY-NH ₂ , YYYHYYY-NH ₂ , ve YYYYYYH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	50
3.5.9	Çifte Protonlanmış HSSSSSS-NH ₂ , SSSHSSS-NH ₂ , ve SSSSSSH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	52
3.5.10	Çifte Protonlanmış HTTTTTT-NH ₂ , TTTHTTT-NH ₂ , ve TTTTTTH-NH ₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	54
BÖLÜM 4. SONUÇLAR.....		58
BÖLÜM 5. KAYNAKLAR.....		60



TÜBİTAK

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Çift Protonlu HAAAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	11
Şekil 2. Çift Protonlu AHAAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	12
Şekil 3. Çift Protonlu AAHAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	12
Şekil 4. Çift Protonlu AAAHAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	13
Şekil 5. Çift Protonlu AAAAHAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	14
Şekil 6. Çift Protonlu AAAAaha-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	14
Şekil 7. Çift Protonlu AAAAAAH-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	15
Şekil 8. Çift Protonlu KAAAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	16
Şekil 9. Çift Protonlu AKAAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	16
Şekil 10. Çift Protonlu AAKAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	17
Şekil 11. Çift Protonlu AAKAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	18
Şekil 12. Çift Protonlu AAAKAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	18
Şekil 13. Çift Protonlu AAAAKA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	19
Şekil 14. Çift Protonlu AAAAAK-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	19
Şekil 15. Çift Protonlu RAAAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	20
Şekil 16. Çift Protonlu ARAAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	20
Şekil 17. Çift Protonlu AARAAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	21
Şekil 18. Çift Protonlu AAARAAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	21
Şekil 19. Çift Protonlu AAAARAA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	22
Şekil 20. Çift Protonlu AAAARA-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	22
Şekil 21. Çift Protonlu AAAAAAR-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	23
Şekil 22. Çift Protonlu HYAGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	24
Şekil 23. Çift Protonlu YHAGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	24
Şekil 24. Çift Protonlu YAHGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	25
Şekil 25. Çift Protonlu YAGHFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	26
Şekil 26. Çift Protonlu YAGFHLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	26
Şekil 27. Çift Protonlu YAGFLHV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	27
Şekil 28. Çift Protonlu YAGFLVH-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	28
Şekil 29. Çift Protonlu KYAGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	29
Şekil 30. Çift Protonlu YKAGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	29
Şekil 31. Çift Protonlu YAKGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	30



TÜBİTAK

Şekil 32. Çift Protonlu YAGKFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	31
Şekil 33. Çift Protonlu YAGFKLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	31
Şekil 34. Çift Protonlu YAGFLKV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	32
Şekil 35. Çift Protonlu YAGFLVK-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	33
Şekil 36. Çift Protonlu RYAGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	34
Şekil 37. Çift Protonlu YRAGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	34
Şekil 38. Çift Protonlu YARGFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	35
Şekil 39. Çift Protonlu YAGRFLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	35
Şekil 40. Çift Protonlu YAGFRLV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	36
Şekil 41. Çift Protonlu YAGFLRV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	37
Şekil 42. Çift Protonlu YAGFLVR-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	37
Şekil 43. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden CCCCC-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	38
Şekil 44. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden FFFFFFF-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	40
Şekil 45. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden GGGGGG-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	42
Şekil 46. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden LLLLLL-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	44
Şekil 47. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden MMMMMM-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	46
Şekil 48. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden VVVVVV-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	48
Şekil 49. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden YYYYYY-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	50
Şekil 50. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden SSSSSS-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	52
Şekil 51. Çift Protonlu Histidinin ihtiva eden TTTTTT-NH ₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu.....	54



TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Table 1. Çifte Protonlanmış, Histidine ve diğer amino asitlerden oluşan model Hepta peptitlerin (M+2H) ²⁺ CID kütle sinyallerinde gözlenen b ₂ ⁺ ve y ₅ ⁺ İyonlarının relative iyon şiddetleri.....	56
Table 2. Çifte Protonlanmış ve Histidine ihtiva eden (M+2H) ²⁺ peptitlerin CID kütle sinyallerinde gözlenen b ₂ ⁺ ve y ₅ ⁺ İyonlarının relative iyon şiddetleri.....	56
Table 3. Çifte Protonlanmış ve Lizin ihtiva eden (M+2H) peptitlerin CID kütle sinyallerinde gözlenen b ₂ ⁺ ve y ₅ ⁺ İyonlarının relative iyon şiddetleri.....	57
Table 4. Çifte Protonlanmış ve Arjinin ihtiva eden (M+2H) peptitlerin CID kütle sinyallerinde gözlenen b ₂ ⁺ ve y ₅ ⁺ İyonlarının relative iyon şiddetleri.....	57



ÖZET

Proteinler, hücre içindeki faaliyetlerin düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptir. Protein içindeki amino asitlerin konumları, birbiriyle olan etkileşimleri, bazik veya asidik amino asitlerin peptit zincirine etkileri proteinlerin hücre içindeki rollerini belirlemekte ve hakkında önemli bilgiler vermektedir. Kütle Spektrometresi (MS) yöntemi, proteinlerdeki amino asit dizilimlerinin bulunmasında oldukça popüler yöntemdir. Proteinler enzimatik bölünmeye uğradığında (Tripsin), kesilmiş peptitlerin C terminalinde, her zaman lizin (K) veya arginin (R) gibi bir bazik amino asit bulunur. Amino asit dizilimlerinde, bazik amino asit ihtiva eden peptit serileri ile, kolaylıkla çoklu protonlanmış peptit iyonları oluşturulabilmektedir. Bu çalışmada, model olarak hepta peptit serileri kullanılmış ve dizilimlerinde bazik amino asitlerden, lizin (K), arginin (R) ve histidin (H), ihtiva eden bu peptitler ile, bu aminoasitlerin pozisyon etkilerini araştırmak için peptit dizisi içinde yerleri değiştirilmiş ve bazik amino asitlerin (C terminaline ve N terminaline yakın) konumunun gaz fazı parçalanma mekanizmasına etkileri detaylı olarak çalışılmıştır.

Sonuç olarak; bütün model peptitlerde, bazik amino asitlerin pozisyonları (N-ucundan sayılarak) 4, 5, 6, ve 7'ci pozisyonlarda olduğu zaman Klas 1 parçalanma mekanizmasına bağlı olarak gözlenen b_2 ve y_5 komplementeri iyonları gözlenebilmektedir. b_2 ve y_5 iyonlarının göreceli iyon şiddetlerinin, bazik amino asitin C-ucuna yaklaştıkça arttığı gözlenmiştir. Pozisyon veya amino asidin yapısı b_2 ve y_5 iyonlarının oluşma mekanizmalarına bir etki gösterdiği görülmektedir. Alanin ihtiva eden birinci model peptit örneklerindeki çalışma sonuçlarına göre, b_2 ve y_5 iyonlarının, bazik amino asitler (N-ucundan sayıldığında) 3. cü pozisyona geldiklerinde gözlenmeye başlanmışken, aynı tür iyonlar, YAGFLV amino asit dizimleri ihtiva eden diğer model peptit örneklerinde 4.cü pozisyona geldiklerinde gözlenmeye başlamışlardır. Sadece Serin ve Treonin amino asitleri diğerlerinden farklı davranış göstermiştir. Histidin C-ucunda bulunduğu diğer sonuçların aksine, y_5 ve b_2 iyonu % 5-10 şiddete sinyal seviyesi göstermiştir.



ABSTRACT

Proteins play vital roles in the maintenance of cellular activities in the cells. The position of amino acids and their interaction within the protein sequence, as well as the effects of basic and acidic amino acids on the peptide chains determines the roles of proteins in cells. Mass Spectrometry (MS) is the most popular method today for the determination of amino acids sequences of proteins. When the proteins undergo enzymatic cleavage (Trypsin), the C-terminal of truncated peptides always contain a basic amino acids such as lysine (K) or arginine (R). Multiply-protonated peptides can be easily formed if the peptide sequence consists of basic amino acid residue. In this work, the peptide chain length is kept constant and the position of basic residues, lysine (K), arginine (R), and histidine (H), is changed within the peptide sequence to probe the effects of position as well as the identity of these amino acid residues on the fragmentation pathways of multiply-protonated.

Class 1 type fragmentation, b_2^+ and its complementary fragment y_5^+ ion were detected for all model peptides by depending their basic amino acid location. When the positions of basic amino acids (counted from the N-terminus) are in positions from 4 to 7, the b_2 and y_5 ions were observed. The relative ion intensities of b_2 and y_5 ions increase as basic amino acid residues approach the C-terminus of position. b_2 and y_5 ions began to be observed when the basic amino acids came to the 3rd position for alanine series; in contrast, they began to be observed when they came to the 4th position in the YAGFLV-NH₂ model peptides. Only Serine and Threonine amino acids have shown different behaviour among all of them. The intensity of y_5 vs b_2 ion was observed around 5-10 % when histidine residue on the C-terminal position.



1.1 Kütle Spektrometresi ile Peptitlerin Sekanslarının Bulunması

Çift-protonlu peptit iyonlarının gaz-fazı parçalanma mekanizmaları hakkında detaylı çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Son yıllarda yapılan tek detaylı çalışma, 2009 yılında Alex Harrison tarafından yapılmış bir çalışmadır.

Literatürde tekli protonlanmış peptitler ile yapılmış binlerce çalışma mevcuttur ve gaz fazı reaksiyon mekanizmaları detaylı bir şekilde araştırılmış ve aydınlatılmıştır. Böyle olduğu halde, yan zincirlerinde hidroksil grubu ihtiva eden beşli peptitler ile yapılan çalışmada, gaz fazında, OH grubunun, C-terminal pozisyonuna transfer olduğu ve C-terminal pozisyonunda bulunan iki amino asit ile birlikte protonlanmış olarak peptitin ana zincirinden koptuğu tarafımızdan 2013 yılında raporlanmıştır.(Atik ve Yalcin, 2013) Ayrıca, sekansında asetilenmiş lizin bulunduran, bn (n=4-7) iyonları ile yapılan çalışmada, lizin hangi pozisyonda olursa olsun, gaz fazı reaksiyonu sırasında, her zaman C-terminal pozisyonuna geçmekte ve daha sonra bu pozisyondan nötür bir şekilde ana zincirden kopma mekanizması göstermektedir. Geriye kalan peptit zinciri ise, ilginç bir şekilde, protonlanmış ve her iki ucunda NH₂ grubu bulunduran peptit sinyali gösterdiği, grubumuz tarafından 2014 yılında raporlanmıştır (Atik vd., 2014) Bu bilgiler kullanılarak, peptit sekansında OH ihtiva eden grup olup olmadığı, veya lizin yan zincirine asetil grubu takılıp takılmadığı konusunda ekstra bilgiler elde edilmiştir.

Çok detaylı çalışmış olan tekli protonlanmış peptitlerin gaz fazı reaksiyon çalışmalarında bile hala yeni informative sonuçlar elde edilebilmekte ve literatüre yeni katkılar getirmektedir.

Proteomik çalışmalarında, tripsin enzimi ile küçük peptitlere bölünen proteinler, genellikle, C-ucunda, lizin veya arjinin kalacak şekilde kesilir ve bu peptitlerin tekli veya çoklu protonlanmış MS/MS kütle spektrometre sonuçları kullanılarak databaz taraması ile, elde edilen peptitlerin sekans bilgileri kullanılarak hedeflenmiş veya seçilmiş proteinlerin amino asit sekansları bulunmaya çalışılmaktadır. Bunun içinde, mevcut biyoinformatikçiler tarafından yazılmış algoritmalar kullanılmaktadır. Ancak, bazı durumlarda bu bilgilere ulaşma doğruluğu, elde bulunan mevcut bilgiler ışığında yazılmış olan algoritmaların yetersiz olmalarından kaynaklandığı bilinen bir gerçektir. Ayrıca, bünyesinde bazik amino asit ihtiva eden peptitlerin, elektriksel püskürtme metodu ile yapılan çalışmalarında, çoklu protonlanmış peptit sinyalleri oluşturdukları ve bu tür peptitlerin gaz fazı parçalanma mekanizmaları ile çok detaylı çalışmalar yapılmadığıda bilinilmektedir. Bu tür, çoklu protonlanmış peptitlerin gaz fazı reaksiyon mekanizmalarının çalışılması neticesinde, elde edilecek sonuçlar, yeni



biyoinformatik bilgiler ile daha kapsamlı algoritmalar ve dolayısıyla hedef proteinlerin amino asit sekanslarının doğru belirlenebilme olasılığını arttırmış olacaktır.

Bu proje kapsamında $[M+2H]^{2+}$ (çift-protonlu) peptit iyonlarının gaz-fazı parçalanma mekanizmaları detaylı ve sistematik olarak çalışılmıştır. Proteinlerin tripsin enzimi ile kesilmesiyle, peptitlerin C-ucunda lizin (K) ve arjinin (R) amino asiti genel olarak bulunabilmektedir. Bu iki amino asit bazik amino asittir ve protona ilgileri çok yüksektir. Dolayısıyla C-ucunda K ve R içeren peptitler, kolaylıkla $[M+nH]^{n+}$ iyonu oluşturabilmektedir. Literatürde sadece (Harrison 2009) C-ucunda histidin (H) içeren model peptitlerin $[M+2H]^{2+}$ iyonlarının CID-MS/MS çalışması mevcuttur. Bu proje kapsamında, üç farklı model peptitler sistematik olarak çalışılmıştır.

Proje süresince, ilk olarak bir tane bazik (H, R veya K) ve altı tane alanin (A) amino asitlerini içeren peptit türevleri detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Bu peptit türevleri sırasıyla, XAAAAAA-NH₂, AXAAAAA-NH₂, AAXAAAAA-NH₂, AAAXAAA-NH₂, AAAAXAA-NH₂, AAAAAAXA-NH₂ ve AAAAAAX-NH₂ peptit türevi olarak seçilmiştir. X harfi histidin, arjinin veya lizin amino asitini temsil etmektedir. Bu model peptitler bazik amino asit ihtiva ettikleri için $[M+2H]^{2+}$ iyonu, gaz-fazında kolayca oluşturulmaktadır. Son yıllarda Harrison tarafından yapılan çalışmada (Harrison 2009) sadece peptitlerin C-ucunda histidin amino asiti vardır ve diğer amino asitler alaninden (A) oluşmaktadır. Peptit uzunluğunun $[M+2H]^{2+}$ iyonun parçalanmasına olan etkisi araştırılmıştır. Bu projede ise model peptitlerin içindeki hem bazik amino asit hem de bazik amino asitin pozisyonu değiştirilerek, çalışma detaylandırılmıştır.

Ayrıca, model peptitler olarak Alaninlerin yerine, tirozin (Y), alanin (A), glisin (G), fenilalanin (F), lösin (L) ve valin (V) amino asitleri kullanılmış ve bazik amino asitler (H, R veya K) aynı şekilde, peptit türevlerinde X, olarak gösterildiği gibi detaylı çalışılmıştır. Çalışılan peptit türevlerinin sekanları, XYAGFLV-NH₂, YXAGFLV-NH₂, YAXGFLV-NH₂, YAGXFLV-NH₂, YAGFXLV-NH₂, YAGFLXV-NH₂ ve YAGFLVX-NH₂ olarak belirlenmiştir. Böylece bazik amino asitin, pozisyonunun etkisinin, mevcut amino asit dizilimlerinde ve ilk olarak çalışılan ve sadece alanine ihtiva eden peptit serisine göre nasıl değişim gösterdiği detaylandırılmıştır. Bu çalışma neticesinde, farklı amino asitlerden oluşan peptit zincirinin çift-protonlanmış peptit iyonlarının parçalanmasına etkisi olup olmadığı, çift-protonlanmış yapıların davranışlarının peptit dizilimindeki amino asitlerden etkilenip etkilenmediği araştırılıp sonuçlandırılmıştır.

Projenin son aşamasında ise, HXXXXXX-NH₂, XXXHXXX-NH₂, XXXXXXH-NH₂ (H=Histidin ve X = glisin (G), serin (S), treonin (T), tirozin (Y), fenilalanin (F), lösin (L), valin (V), sistin (C) ve metionin(M)) peptit serileri ile detaylı çalışmalar yapılmış ve çift-protonlanmış peptit iyonlarının CID kütle spektrumları incelenerek bazik bir amino asit olan histidinin farklı amino



TÜBİTAK

asitlerin değişik pozisyonlarında (1., 4., ve 7. pozisyonlar) bulunduğunda gaz fazı parçalanma mekanizmalarına etkisi gösterilmiştir.

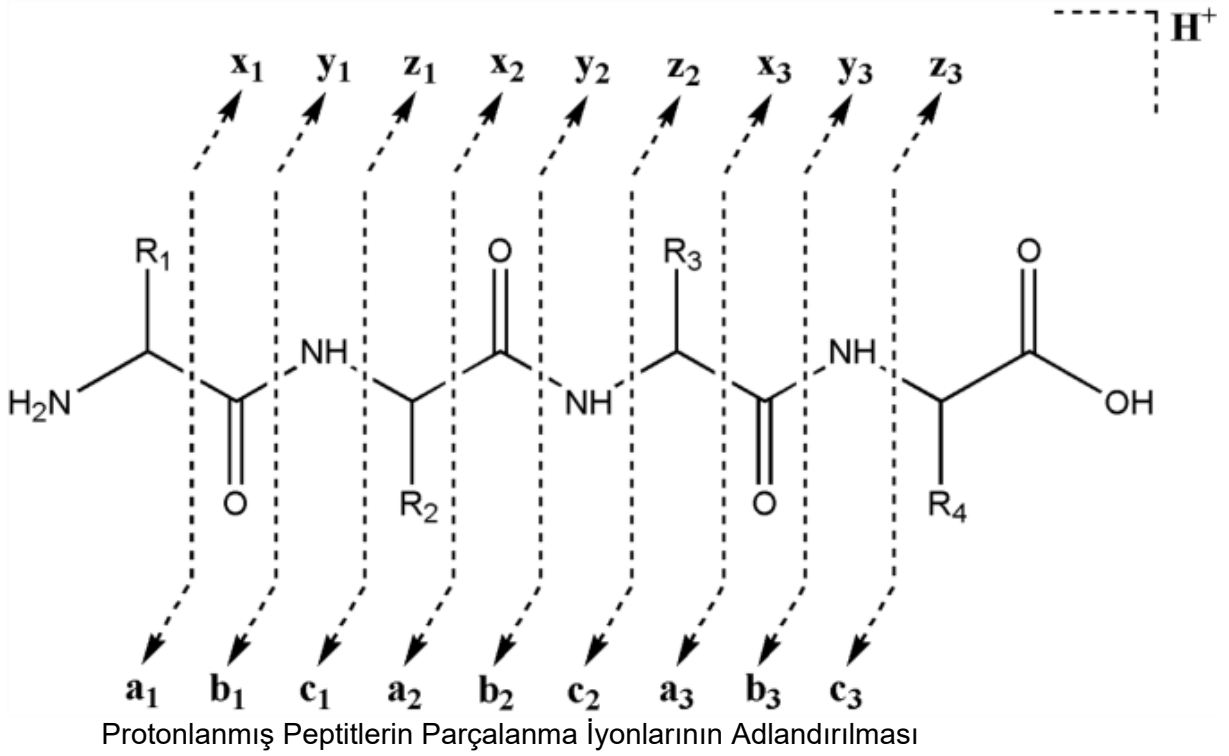
Bu üç tip model peptit serileri ile literatürde yapılna ilk detaylı çalışmadır ve elde edilen sonuçlar , amino asitlerin yan zincilerinde bulunan fonksiyonel gruplara bağlı olarak değişik mekanizmalar ve oluşum yolları izlediği gözlenmiştir.

Proteinler, hücrelerdeki biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesini ve belli bir düzen içinde yürümesini sağlayan makromoleküllerdir. Proteinler, 20 doğal amino asitin peptit bağı yapmasıyla oluşan biyopolimerlerdir. Genel olarak amino asitlerin yapısını merkez karbon atomuna bağlı amin grubu (-NH₂), karboksil grubu (-COOH) ve hidrojen (-H) oluşturur. Dördüncü bileşen ise yan zincir (-R) olarak adlandırılmaktadır ve aminoasitlerin bazik, asidik, polar veya apolar özellikte olmaları bu yan zincirlerinin değişik kimyasal bir yapıya sahip olmaları ile açıklanır.

Günümüzde kütle spektrometresi (MS) ve yumuşak iyonlaştırma tekniklerinin gelişmesiyle, proteinlerin amino asit dizilimleri, çok daha hızlı ve güvenilir bir şekilde bulunabilmektedir (Aebersold ve Goodlett 2001). Elektriksel püskürtme ile iyonlaştırma (ESI) ve matris-destekli lazer yardımıyla-iyonlaştırma (MALDI) teknikleri, yumuşak iyonlaştırma teknikleri olarak 1990 yıllarının başından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (Fenn vd., 1989; Karas ve Hillenkamp 1988; Tanaka vd., 1988). Uçucu olmayan proteinler veya peptitler, bu teknikler sayesinde parçalanmadan gaz-fazına geçirilebilmekte ve iyonlaşmaları sağlanmaktadır.

Proteinlerin amino asit sekanlarının bulunması için, proteinler, enzim (genellikle tripsin) yardımı ile küçük peptitlere kesilirler. Kesilen bu peptitlerin, kütle spektrometre yardımı ile kısmi amino asit dizilimleri bulunur (Shevchenko vd. 1996). Gaz-fazında protonlanmış veya çoklu protonlanmış peptit iyonlarının her biri ayrı ayrı izole edilir ve inert olan (reaksiyona girmeyen) bir gaz (He, Ar, Xe veya N₂) ile çarpıştırılır ve iyonlara ekstra enerji yüklemesi yapılır. Her biri izole edilmiş olan bu peptitlerden, diziliminde bulunan amino asitlere özgü kopmalar gözlemlenebilir ve oluşan parçalanma ürünleri kullanılarak sekansı bilinmeyen peptitlerin sekansları ortaya çıkartılır.

Parçalanma sırasında artı yük peptitin N-ucu tarafında kalırsa oluşan iyonlar *a*, *b*, *c*; C-ucu tarafında kalırsa *x*, *y*, *z* olarak adlandırılmaktadır (Roepstorff and Fohlmann 1984; Biemann 1988).



Peptitlerin düşük enerjili çarpışmayla-indüklenmiş ayrışma (collision-induced dissociation, CID) ikili kütle spektrometresi (MS/MS) ile parçalanması sonucunda *b*, *a* ve/veya *y* iyonları oluşur.

Bu iyonlar peptit bağının (CO-NH) kopması sonucu oluşmaktadır ve kütle spektrumunda baskın olarak gözükmemektedir. Bu iyonlar peptitlerin amino asit dizilimlerinin bulunmasında aktif rol oynamaktadır. Grubumuz tarafından 1995 ve 1996 yıllarında yapılan çalışmalarımızda *b* iyonunun gaz-fazı yapısının beş halkalı okzazolon olduğu deneysel sonuçlar ile gösterilmiştir (Yalcin vd., 1995; 1996). Fakat *y* iyonlarının yapısı kesilmiş peptit ya da protonlanmış amino asit yapısında, yani lineer olduğu gösterilmiştir (Cordero vd., 1993).

Özellikle proteinler tripsin enzimi ile parçalanması sonucu elde edilen peptitlerin C-uçlarında lizin veya arjinin amino asiti bulunmaktadır. Bu amino asitler bazik amino asit sınıfındadır ve proton ilgileri diğer amino asitler ile kıyaslandığında oldukça yüksektir (Harrison 1997). C-ucunda bazik amino asit içeren peptitler gaz-fazında doğal olarak çoklu-proton ihtiva ederler. Literatürde çoklu protonlanmış peptitlerin gaz fazı reaksiyon mekanizmaları ile çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Savitski ve arkadaşları (2008) tarafından, triptik peptitlerin çift-protonlanmış örneklerinin CID kütle spektrumlarını incelediklerinde, bu peptitlerdeki kopmaların iki sınıfta incelenebileceği göstermişlerdir. Buna göre sınıf 1 diye adlandırılan kopmalarda, *n* peptitte bulunan amino asit sayısı olmak üzere, *b₂/y_{n-2}* kopmaları görülmüştür.



Diğer yandan, sınıf 2 olarak belirtilen grup kopmaların da ise b_2/y_{n-2} iyonlarına ek olarak peptidin N-ucuna yakın olan 4. veya 5. peptit bağı (amid bağı) koştuğu söylenmiştir.

Diğer yandan Bythell ve arkadaşları (2009) tarafından YIGSR, YGGFLR, YIYGSKF model peptitlerinin elde edilen çift-protonlu peptit iyonlarının gaz-fazı parçalanma reaksiyonları incelenmiş ve kopma ürünlerinin sınıf 1 grubuna dahil oldukları raporlanmıştır. Bu çalışmaya ek olarak yapılan teorik çalışmalarda oluşan b_2 peptit iyonlarının diketopiperazin yapısına değil de okzazon yapısına sahip olduğu gösterilmiştir.

Harrison (2009) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise peptit C-ucunda histidin (H) içeren model peptitler sistematik olarak çalışılmıştır. Bu model peptitler şu şekildedir: (Ala) $_x$ His ($x=5, 6, 7, 8, 10$). Çift-protonlu peptit iyonlarının parçalanma mekanizmasının peptit zincir uzunluğuna olan bağılıklarının nasıl değiştiği araştırılmıştır. Bu çalışmada histidin her zaman peptitlerin N-ucu'nda konumlandırılmış olmasına rağmen alanin sayısı arttıkça kütle spektrumlarında farklılıklar gözlemlenmiştir. b_2/y_{n-2} kopmaları A_5H, A_6H, A_7H, A_8H örneklerinde en şiddetli kopmalar olarak görülürken, $A_{10}H$ peptitinde bu kopmalara ait iyon şiddetlerinin diğerlerine kıyasla oldukça azaldığı saptanmıştır. Ayrıca A_6H peptit örneğinin tek protonlu CID kütle spektrumu incelendiğinde b_2/y_{n-2} eğiliminin olmadığı gösterilmiştir ve bu durumun çift protonlanmış peptit iyonları için geçerli olduğu gözlemlenmiştir.

Benzer şekilde, Alex G. Harrison'un (2009) yaptığı diğer bir çalışmada, çift-protonlu peptit iyonlarının yukarıda belirtilen simetrik y_5/b_2 kopmalarının yanısıra y_5^{2+} ve nötral b_2 kopmalarının da oluştuğu belirtilmiştir. AAXAAAR ($X= A, S, V, T, I, F, M, W, P, N$ ve sarkosin-Sar) model peptit serilerinin çift-protonlu peptit iyonlarına ait CID kütle spektrumları incelendiğinde, peptitlerin N-ucu tarafındaki ikinci amit bağından kopmalar görülmüştür. Bu kopmalar b_2/y_5 simetrik kopması ve çift protonlu y_5 ve nötr b_2 asimetric kopması ile yarış halindedir. $X =$ serin (S) veya treonin (T) iken çift protonlanmış peptit iyonlarının MS/MS spektrumlarında su (H_2O) kopması, $X =$ prolin (P) veya sarkosin (Sar) iken çift protonlu y_5 ve nötr b_2 asimetric kopması maksimum şiddette görülmüştür. Diğer peptitlerde ise ikinci amit bağından kopmaların yarış halinde olduğu belirtilmiştir.

Yine, Alex G. Harrison (2010) tarafından yapılan bir sistematik çalışmada APAAAAR, AAPAAAAR, AAAPAAAR, AAAAPAR model peptitleri kullanılarak çift protonlu peptit iyonlarının CID kütle spektrumları incelenmiştir. Bu rapora göre protonlardan birinin bazik bir amino asit olan arjinin (R) üzerinde sabitlendiği diğer protonun ise 'mobil proton' olduğu gösterilerek prolinin (P) etkisi olup olmadığı bulunmaya çalışılmıştır. Prolin amino asiti arjinine yaklaştıkça kütle spektrumunda gözlenen y_5/b_2 simetrik kopması araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, güçlü bir prolin etkisi olduğu görülmüş ve prolinin arjinine yaklaştıkça y_5/b_2 iyon oranının arttığı, çift protonlu y_5 /nötr b_2 asimetric kopmasının ise azaldığı gözlemlenmiştir.



TÜBİTAK

Yukarıda bahsedilen çalışmalar hep peptit ana iyonlarının parçalanma mekanizmaları üzerinedir.

Diğer bir çalışmada ise Li ve arkadaşları (2010) tarafından üç peptitten elde edilen çift-protonlu *b* iyonlarının yapıları CID ve ECD (ECD, elektron-kapmalı ayrışma) metotları ile incelenmiştir. *b* iyonlarının gaz-gazında birkaç formun karışımı halinde bulunduğu teorik ve deneysel olarak ispatlanmıştır. *b* iyonunun yapısındaki farklılıklara neden olan etmenler olarak *b* iyonunun büyüklüğü, N-ucunun yapısı ve bazik amino asidin yan grubu etkisi olarak rapor edilmiştir. *b* iyonlarının halkalı yapıları kıyaslandığında küçük amino asitlerden oluşan *b* iyonlarının halkalı yapı oluşturmaya daha yatkın olduğu saptanmıştır. Bunun nedeninin büyük *b* iyonlarının halkalı konformasyon oluşturma olasılığını düşürmesi olduğu belirtilmiştir.



TÜBİTAK 1.3 Projenin Amacı

Proteomik çalışmaların temelini hücre içerisindeki proteinlerin doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanması oluşturmaktadır (Aebersold ve Goodlett 2001). Proteinlerin tanımlanması ise enzim ile küçük peptitlere bölünmesi ve daha sonra bu peptitlerin kütle spektrometresi ile amino asit dizilimlerinin bulunması ile mümkündür (Shevchenko vd. 1996). Kullanılan enzim çoğu zaman tripsin olduğu için, genelde tripsin ile küçük peptitlere bölünen proteinlerin C-uçlarında lizin (K) veya arjinin (R) amino asitleri bulunmaktadır ve bu tür peptitler kütle spektrometresinde kolaylıkla çoklu protonlanmış peptit sinyalleri vermektedir. Bundan dolayı, kütle spektrometresi yöntemi kullanılarak gaz-fazı reaksiyon mekanizması incelemelerindeki amaç, insanın yapı taşı olan proteinlerin sekanslarının doğru bir şekilde bulunabilmesidir. Böylece, model peptit örnekleri üzerinde yapılacak sistematik çalışmalar sonucunda elde edilecek bilgiler yardımıyla, bilinmeyen proteinlerin sekanslarının bulunmasında güvenilir bir veritabanı oluşturulabilecektir.

Burada yapılması planlanan çalışma ile de birden fazla protonlanmış peptit örneklerinin gaz-fazı parçalanma mekanizmaları detaylandırılacak ve amino asitlerin pozisyonunun, değişik amino asit gruplarının parçalanma esnasında nasıl davranacakları ve ne tür bilgiler verecekleri, kütle spektrometresi ile detaylı bir şekilde incelenecektir. Böylece birden fazla proton kazanmış peptit modellerinin parçalanma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması sağlanacaktır.

Yapılması planlanan çalışma ile ulaşılması beklenen hedef; birden fazla protonlanmış peptit örneklerinin gaz fazı parçalanma mekanizmaları, amino asitlerin pozisyon etkileri, ve yan grup etkileri detaylandırılarak çalışılmasıdır. Bu sayede, çoklu protonlanmış MS/MS sonuçları yardımıyla, proteinlerden enzim ile bölünmesi sonucu oluşan küçük peptit örneklerinden ne tür faydalı bilgiler elde edebileceğimiz detaylandırılacaktır. Bu amaçla, HXXXXXX-NH₂, XXXHXXX-NH₂, XXXXXXH-NH₂ (X = A, C, F, G, L, M, S, T, V, Y), XAAAAAA-NH₂, AXAAAAA-NH₂, AAXAAAA-NH₂, AAAXAAA-NH₂, AAAAXAA-NH₂, AAAAAXA-NH₂, AAAAAAX-NH₂, XYAGFLV-NH₂, YXAGFLV-NH₂, YAXGFLV-NH₂, YAGXFLV-NH₂, YAGFXLV-NH₂, YAGFLXV-NH₂, ve YAGFLVX-NH₂ (X= H, K, R) peptit türevleri kullanılacaktır. Yapılacak olan çalışmada, kullanılacak olan bazik amino asitlerin (His, Arg, Lys) konumlarındaki farklılıkların (C-ucu ve/veya N-ucu'na yakınlık) mekanizmaya etkileri araştırılacaktır.

Ayrıca, farklı proton ilgisine sahip bazik amino asitlerin, sistematik bir çalışmayla, birbiriyle kıyaslanması, bazik amino asitlerin, peptit gaz-fazı parçalanma davranışlarını ne yönde etkileyeceğinin bulunmasında etkili bir rol oynayacaktır. Peptit zincirindeki amino



TÜBİTAK

asitler çeşitlendirilerek, kullanılacak olan bazik amino asitlerin (His, Arg, Lys) yanısıra ana zincirdeki amino asitlerin iki proton kazanılmış gaz-fazı parçalanma mekanizmasına etkisinin olup olmadığı, etkisi varsa ne derecede etkileyeceği araştırılacaktır. Bunun sonucunda, peptit örneklerindeki, bazik grup bulunduran amino asitlerin pozitif iyon modundaki gaz-fazı parçalanma mekanizmasındaki görevi daha da detaylandırılabilir. Ayrıca bu projede çalışacak doktora, master, öğrencileri modern kütle spektrometre tekniklerini ve uygulamalarını öğrenecektir. Türkiye’de son yıllarda en çok satılan ve kullanılan sistemlerin başında modern kütle spektrometresi gelmektedir ve ülkemizde bu alanda çalışacak eleman açığı çok fazladır. Özellikle modern kütle spektrometresinin biyolojik uygulamaları konusunda çalışma yapabilecek ve kütle spektrometresini detaylı bir şekilde kullanabilecek kişi sayısı çok azdır



Deneyler sırasında kullanılan tüm model peptitler GL Biochem Ltd. (Şangay, Çin) firmasından temin edilmiştir ve herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan direkt kullanılmıştır.

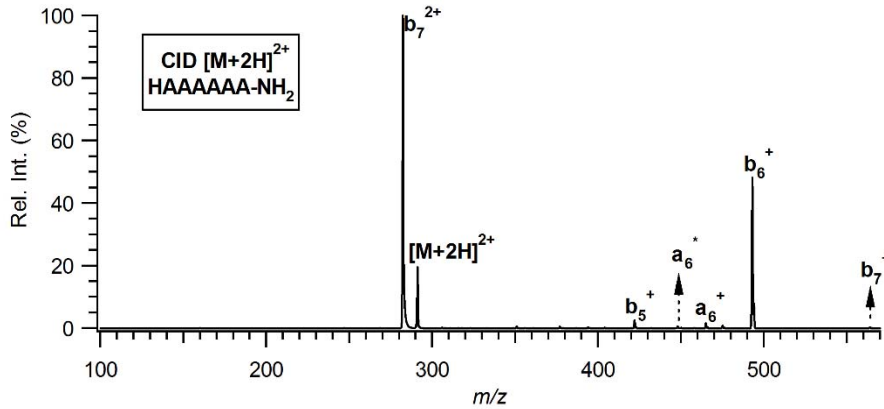
Yaklaşık 2 mg tartılan peptitler hacimce 50:50 metanol ve ultra saf su içeren çözeltide çözülmüştür ve böylece yaklaşık 10^{-3} M peptit stok çözeltileri elde edilmiştir ve -20 °C'de saklanmıştır. Kütle spektrometresine direkt enjekte edilen peptit konsantrasyonu ise 100 μ M'dir ve bu çözelti hacimce 49:49:2 metanol:ultra saf su: 1% Formik asit içeren çözeltide hazırlanmıştır.

MS/MS deneyleri için elektropüskürtme iyonlaştırılmalı (ESI) LTQ XL lineer iyon tuzaklı kütle spektrometresi (Thermo Finnigan, San Jose, CA) pozitif iyon modunda kullanılmıştır. Örneğin akış hızı dakikada 5 μ L'dir ve peptitlere ait $[M+2H]^{2+}$ 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.

3.1 AAAAAA-NH₂ ve Bir Adet Histidin, H, Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi.

Bu proje kapsamında (M+2H)²⁺ (çift protonlu), bir tane bazik (X= H, K ve R) ve altı tane de alanin (A) amino asitleri içeren model peptitlerin gaz fazı parçalanma mekanizmaları çalışılmıştır. Bu peptit türevleri sırasıyla şu şekildedir: XAAAAAA-NH₂, AXAAAAA-NH₂, AAXAAAA-NH₂, AAAXAAA-NH₂, AAAAXAA-NH₂, AAAAAXA-NH₂, ve AAAAAAX-NH₂. X ifadesi, histidin, lizin ve arjinin amino asitlerini temsil etmektedir. Bu peptitlerin sekanslarında bazik amino asit bulduğu için, kolaylıkla çift protonlu iyonlar oluştrubilmektedir.

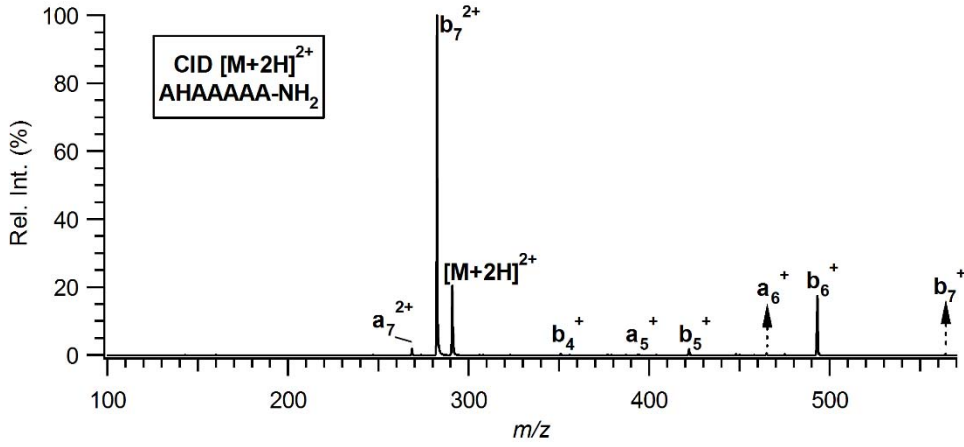
Bu çalışmada, ilk olarak, sekasında bir histidine, (H), ve altı tane alanine amino asit bulunduran peptit serisi detaylandırılmıştır. Şekil 1 de model peptiden elde edilen kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 1. Çift Protonlu HAAAAAA-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

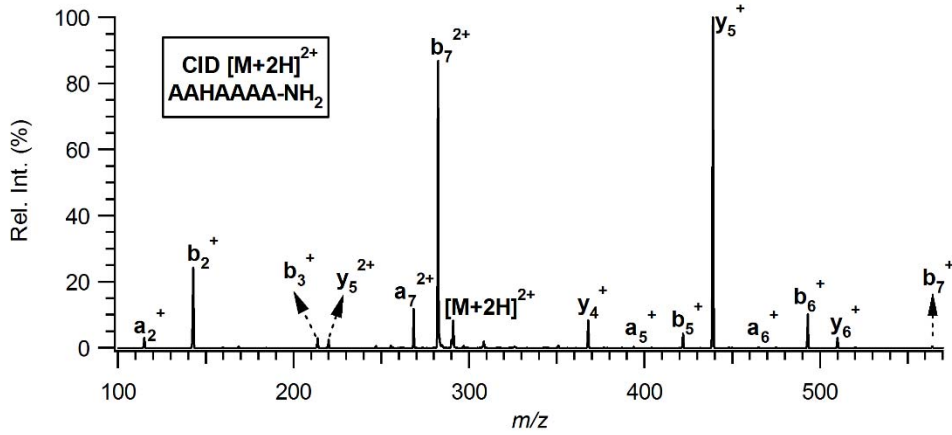
Şekilde de görüleceği üzere çift protonlanmış ana iyondan elde edilen MS/MS kütle sinyalinde çift protonlanmış b₇²⁺ iyonu en şiddetli sinyal olarak gözlenmektedir. Ayrıca, tekli protonlanmış b-iyon serisinde (b_n, n= 5-7) gözlenmektedir. Bazik amino asitin N-ucu pozisyonunda bulunması, y-türü iyon oluşmasını engellemiş olarak görülmektedir.

Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, ikinci sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 2. de verilmektedir.



Şekil 2. Çift Protonlu AHAAAAA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Detaylı incelendiğinde iki şekil arasında çok büyük bir fark görülmemektedir. Bunu sebebini bazik amino asidin pozisyonunun hala N-ucuna yakın olduğu içindir. Özellikle b ve y iyon türleri, yükün C-ucunda veya N-ucunda olmasına göre oluşmaktadır. Ayrıca oluşan iyonun gaz fazı proton afinitesinde hangi tür iyonlar oluşacağını ve sinyal şiddetlerinin ne olabileceğini belirlemektedir. Hala hiç bir y-türü iyon gözlenememiştir. Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, üçüncü sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 3. de verilmektedir.



Şekil 3. Çift Protonlu AAHAAAAA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

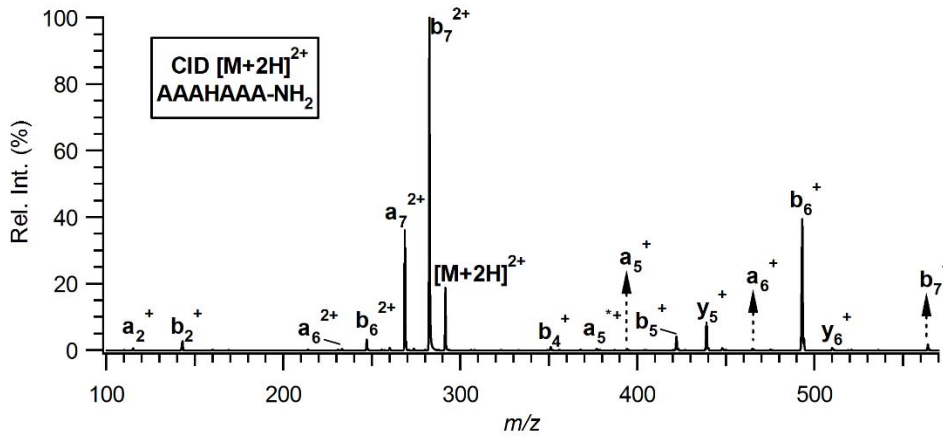
Detaylı incelendiğinde, peptitlerin parçalanma mekanizmaları çalışmalarında gözlenen iyon türlerinin hemen hemen hepsi gözlenmemektedir. Gözlenmemiş olan y-türü iyonlar (tekli ve çift protonlanmış olarak) ve b-türü iyonlar (çifte ve tekli protonlanmış) olarak MS/MS kütle spektrumunda gözlenmektedir. Ayrıca literatürde Klas 1 türü iyon türü olan b₂-y₅ iyon türünde CID spektrumundaki en şiddetli sinyal olarak gözlenmektedir. b₂-y₅ iyon oluşumu aynı bağın



TÜBİTAK

kopması sonucu b_2 ve/veya y_5 iyonlarının oluşmasına olanak sağlamaktadır. Bu gözlem, literatürde Klas 1 [b_2 ve y_{N-2} (N = toplam amino asit sayısı)] yük ayrılma (charge separation) mekanizması olarak açıklanmaktadır. Çift protonlanmış olan bu peptitte, bazik amino asit, N-ucunun üçüncü pozisyonuna geldiğinde, yükün birisi bazik amino asidin üstünde, sabit bir şekilde ilerlemekte, ve diğer yük ise, muhtemelen serbet amin grubunun üzerinde bulunmaktadır. Bazik amino asit N-ucundan, C-ucuna doğru hareket ettirildiğinde ve özellikle üçüncü sıraya geldiğinde, hareketli tabir edilen ikinci proton ise, N-ucuna geldiğinde, Klas 1 tipi parçalanma mekanizması tetiklenmekte ve birbirinin komplementeri olan bu iki iyon türünde tekli protonlanmış iyonlar, en güçlü sinyal olarak (özellikle y_{n-2} , $N=7$) gözlenmektedir.

Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, dördüncü sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 4. de verilmektedir.



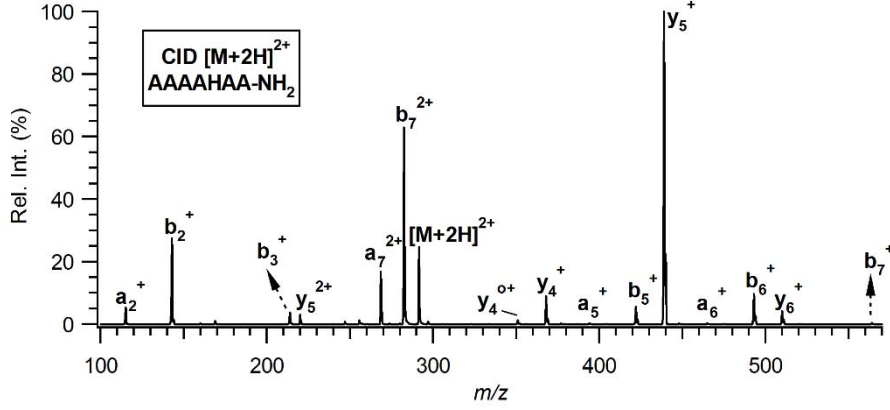
Şekil 4. Çift Protonlu AAAHAAA-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

Burada gözlemlenen en ilginç olay, komplementeri parçalanma sonucunda oluşan ve Klas 1 türü mekanizmayla açıklanan b_2 - y_{N-2} ($N=7$) iyonlarının MS/MS kütle spektrumunda sinyal şiddetlerini kaybetmeleri. Sabit iyon yükünün bazik amino asit üstünde durduğu varsayımı baz alındığında, iyon sinyal şiddetlerinin düşme sebebi olarak, bazik amino asidin her iki ucuda eşit uzaklıkta bulunmasından dolayı, ve hareketli protonun ise her iki serbet amin grubuna aynı oranda dolaşım sağlayabildiği varsayımı göz önüne alındığında, b_2 - y_{N-2} ($N=7$) iyonlarının sinyal şiddetlerinin neden birden düştüğü anlaşılmaktadır. Bunun yanında, diğer iyon türleri (a, b, ve y iyon türleri) değişik sinyal şiddetlerinde gözlenmektedir.



TÜBİTAK

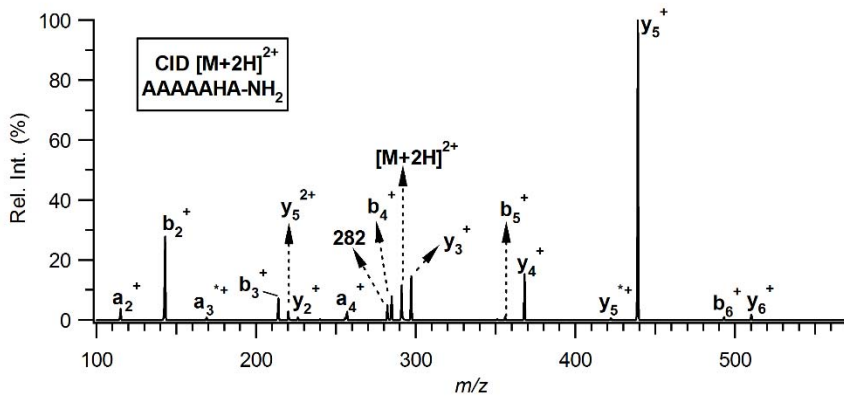
Bazık amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, beşinci sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 5. de verilmektedir.



Şekil 5. Çift Protonlu AAAAHAA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

MS/MS kütle spektrumu incelendiğinde, b₂-y_{N-2} (N=7) iyonlarının sinyal şiditlerini artırdıkları görülmektedir. Birbirinin komplementeri olan bu iki iyon türünden özellikle y_{N-2}, (N=7) iyon türü en güçlü sinyal olarak MS/MS spektrumunda gözlenmektedir. Bunun sebebi, sabit yükün bazık amino asit ile C-ucuna daha yakın durması ve N-ucuna yakın olan diğer hareketli proton ile bu mekanizmayı tetiklediği düşünülebilir.

Bazık amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, altıncı sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 6. de verilmektedir.



Şekil 6. Çift Protonlu AAAAHA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

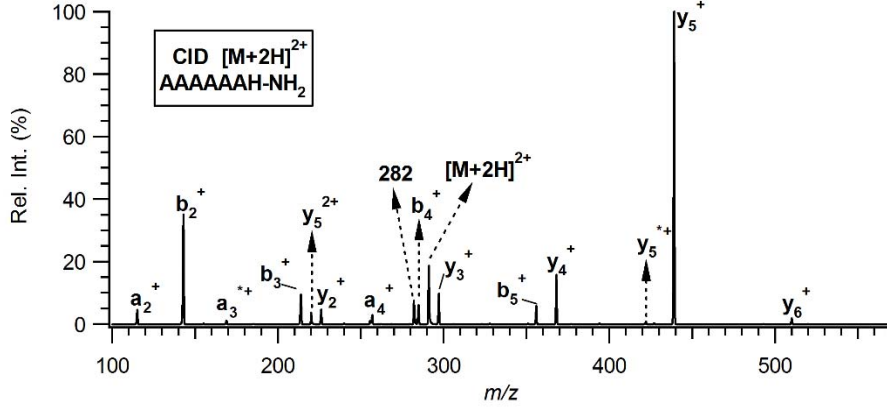
MS/MS kütle sinyali incelendiğinde, b₂-y_{N-2} iyonlarından y_{N-2} iyon türü, hala en şiddetli iyon olarak görülmektedir. Bunun yanında diğer iyon türleri de gözlemlenmektedir. İlginç olan başka



TÜBİTAK

bir gözlem ise, her MS/MS kütle spektrumunda, en şiddetli iyon türünden biri olan b_7^{2+} ve her MS/MS kütle spektrumunda gözlemlenen b_6^+ iyon türlerinin gözlenememesidir.

Bazık amino asit, peptit sekansında N-ucu pozisyonuna getirildiğinde, Klas 1 iyon türünden olan b_2-y_{N-2} ($N=7$) iyonu, MS/MS kütle spektrumunda, en şiddetli iyon olarak gözlemlenmiştir.

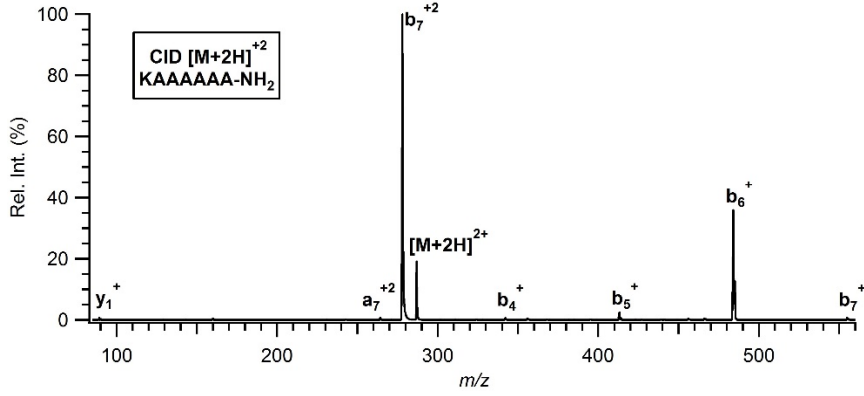


Şekil 7. Çift Protonlu AAAAAAH-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

MS/MS kütle sinyali incelendiğinde, b_2-y_{N-2} komplementeri iyonlarından y_{N-2} iyon türü, hala en şiddetli iyon olarak gözlenmektedir. Bunun yanında diğer iyon türleride gözlemlenmektedir. En şiddetli iyon türünden biri olan b_7^{2+} ve her MS/MS kütle spektrumunda gözlemlenen b_6^+ iyon türleri gözlenememiştir.

3.2 AAAAAA-NH₂ ve Bir Adet Lizin, K, Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

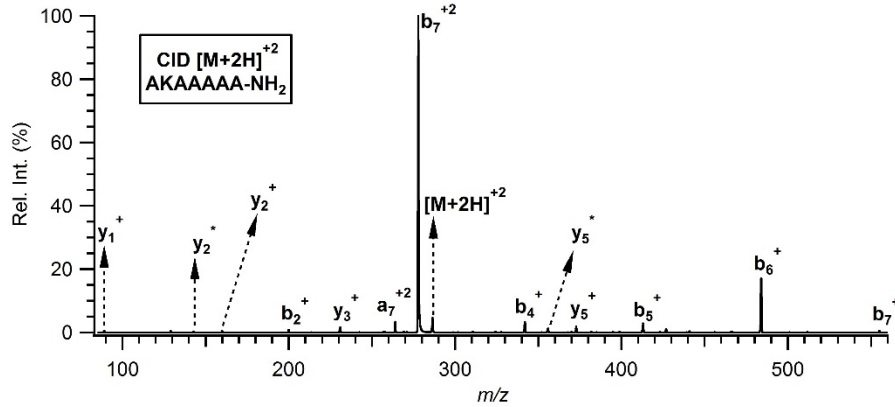
Bu çalışmada, ikinci olarak peptit serisinde, sekansında bir lizin, (K), ve altı tane alanine amino asit bulunduran peptit serisi detaylandırılmıştır. Şekil 8 de model peptiden elde edilen kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 8. Çift Protonlu KAAAAAA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Şekilde de görüleceği üzere çift protonlanmış ana iyonun elde edilen MS/MS kütle sinyalinde çift protonlanmış b_7^{2+} iyonu, en şiddetli sinyal olarak gözlenmektedir ve alanine ihtiva eden model peptitlerde elde edilen sonuçlarla uyum içerisindedir. Ayrıca, tekli protonlanmış b-iyon serisinde (b_n , $n=4-7$) gözlenmektedir. Birinci set model peptitlerden farklı olarak, o set sonuçlarda gözlenmemiş y-türü iyon (y_1) çok küçükde olsa bu model peptidin ilk MS/MS kütle spektrumunda gözlenmiştir. Bunun sebebi, lizin yan zincirinde bulunan serbet amin grubun etkisinden olduğu söylenebilir.

Bazık amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, ikinci sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 9. de verilmektedir.



Şekil 9. Çift Protonlu AKAAAAA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

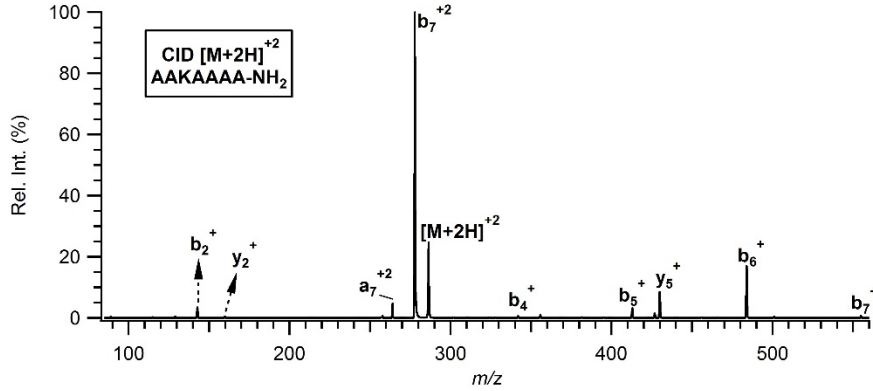
Detaylı incelendiğinde iki şekil arasında ilk model peptide görülmeyen büyük bir fark görülmektedir. Bunu sebebi, muhtemelen, bazık amino asidin (Lizin) yan zincirinde bulunan serbest amine grubunun, yapısı gereği C-ucundaki veya N-ucundaki ikinci protona çok fazla



TÜBİTAK

etki edemediğinden kaynaklanmaktadır. Özellikle b ve y iyon türlerinin küçük şiddete sinyale sahip olsalarda, MS/MS kütle sinyalinde gözlenmeleri bu şekilde açıklanabilir.

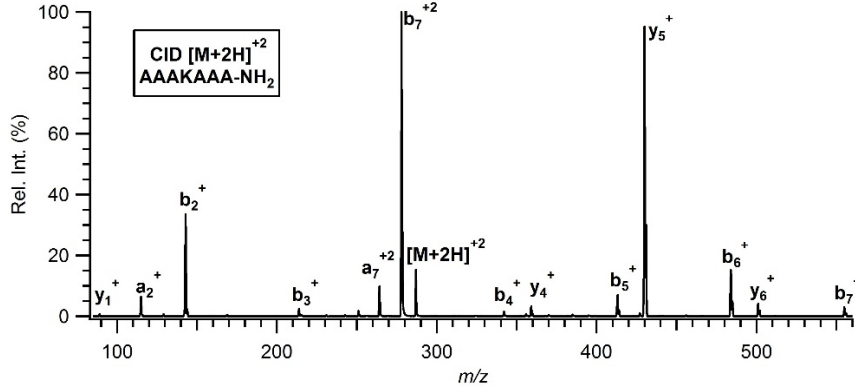
Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, üçüncü sıraya konduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 10. de verilmektedir.



Şekil 10. Çift Protonlu AAKAAAA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Bir önceki model peptitten elde edilen sonuçlarla, bu model peptit de elde edilen sonucun en büyük farkı, Klas 1 türü iyon türü olan b₂-y₅ iyon türü gözleendiği halde, CID spektrumundaki en şiddetli sinyal olmamasıdır. Birinci set model peptitlerin sonuçlarında, histidine bazik amino asidi, peptit sekansının ortasına geldiğinde gözlemlenen sonuç (b₂-y₅ iyon türü sonucu), bu model peptidin setinde, lizin amino asidi N-ucundan 3. sıraya, geldiğinde gözlenmektedir. Görüleceği üzere, burada elde edilen bu sonuç, bazik amino asitlerin yapısal farklılıklarının, pozisyonlarının, parçalanma mekanizmalarını nasıl etkilediğini net olarak göstermektedir.

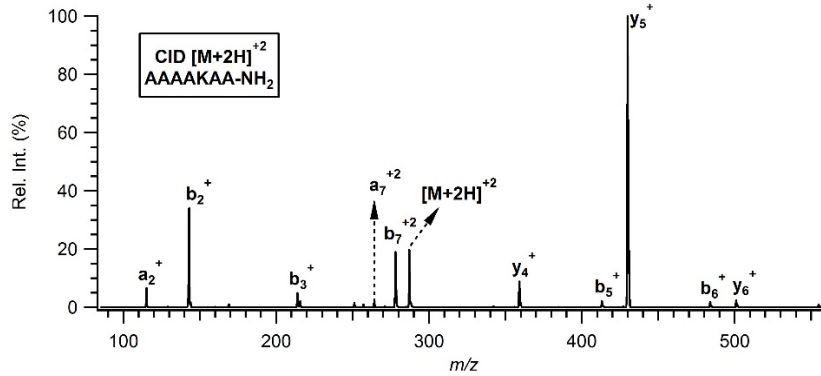
Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, dördüncü sıraya konduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 11. de verilmektedir



Şekil 11. Çift Protonlu AAKAAA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

MS/MS kütle sinyali detaylı incelendiğinde, b₂-y_{N-2} komplementeri iyonlarının, birinci model peptit serisinde gözlenen şekliyle benzer sinyal şiddetinde gözlemlenmektedir. Fakat, y_{N-2} iyon türü, en şiddetli iyon olarak gözlenmemektedir. Bunun yanında diğer üyün türleride gözlemlenmektedir. En şiddetli iyon türü olarak b₇²⁺ gözlemlenmektedir. Diğer iyon türleride (b ve y iyon türleri) MS/MS kütle spektrumunda gözlemlenmektedir.

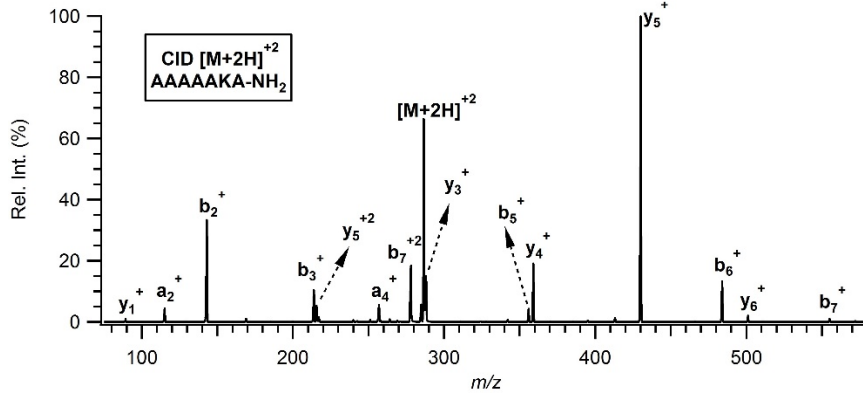
Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, beşinci sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 12. de verilmektedir



Şekil 12. Çift Protonlu AAAAKAA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

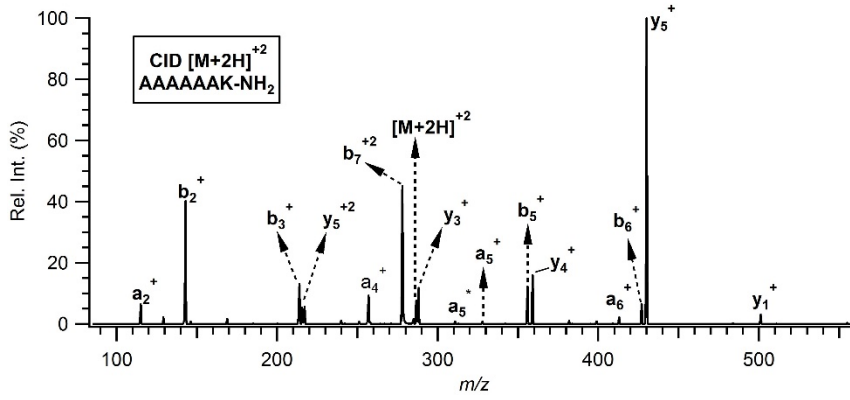
MS/MS kütle sinyali detaylı incelendiğinde, y_{N-2} iyon türü, en şiddetli iyon olarak gözlenmektedir. Bunun yanında diğer iyon türleride gözlemlenmektedir. En şiddetli iyon türü olarak gözlenen b₇²⁺ iyon türü ise, sinyal şiddeti olarak, 20% seviyelerinde gözlenmektedir. Diğer iyon türleride (b ve y iyon türleri) MS/MS kütle spektrumunda gözlemlenmektedir.

Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, altıncı sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 13. de verilmektedir.



Şekil 13. Çift Protonlu AAAAAKA-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

MS/MS kütle spektrumu incelendiğinde, b_2 - y_{N-2} komplementeri iyonlarının, birinci model peptit serisinde gözlenen şekliyle benzer sinyal şiddetinde gözlemlenmektedir. Bunun yanında, çifte ve tekli protonlanmış iyon türleri (b ve y iyon türleri) gözlemlenmektedir. Bazık amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonuna konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 14. de verilmektedir.



Şekil 14. Çift Protonlu AAAAAAK-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

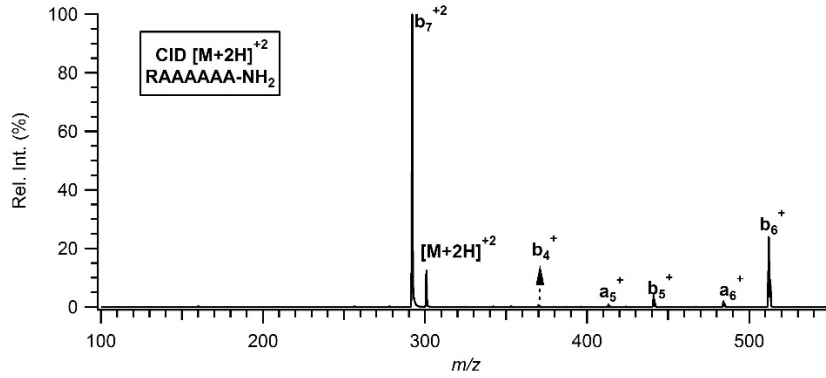
MS/MS kütle spektrumu, bir önceki kütle spektrumu ile benzerlikler göstermektedir. b_2 - y_{N-2} komplementeri iyonları, diğer sonuçlar gibi, benzer sinyal şiddetinde gözlemlenmektedir. Klas 1 iyon türünün (b_2 - y_{N-2} komplementeri iyonları), lizin amino asidi N-ucuna yaklaştıkça sinyal şiddetini arttırdığı gözlenmiştir.



TÜBİTAK

3.3 AAAAAA-NH₂ ve Bir Arjinin,R, Bazık Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

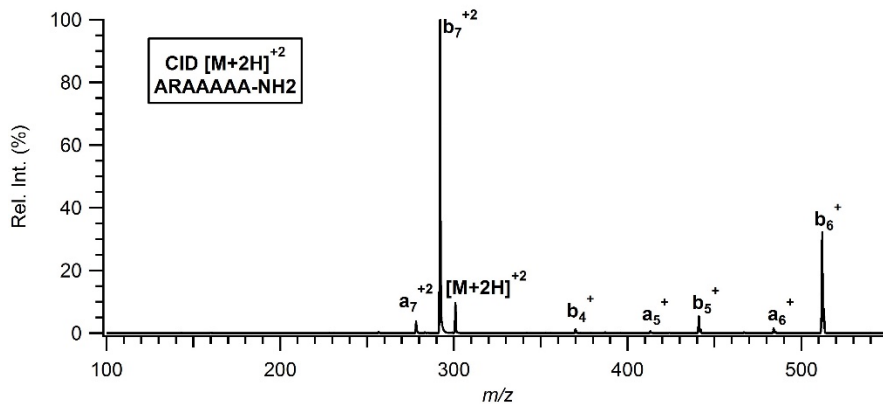
Bu çalışmada, üçüncü olarak peptit serisinde, sekasında bir arjinin, (R), ve altı tane alanine amino asit bulunduran peptit serisi detaylandırılmıştır. Şekil 15 de model peptiden elde edilen kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 15. Çift Protonlu RAAAAAA-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

Şekilde de görüleceği üzere çift protonlanmış ana iyondan elde edilen MS/MS kütle sinyalinde çift protonlanmış b_7^{2+} iyonu, en şiddetli sinyal olarak gözlenmektedir ve birinci ve ikinci set model peptitlerden elde edilen sonuçlarla uyum içerisindedir. Ayrıca, tekli protonlanmış b-iyon serisinde (b_n , $n=4-6$) gözlenmektedir. b-iyonlarından karbon monokside (CO) kopması sonucunda oluşan a-türü iyonlarda gözlenmiştir.

Bazık amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, ikinci sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 16. de verilmektedir.



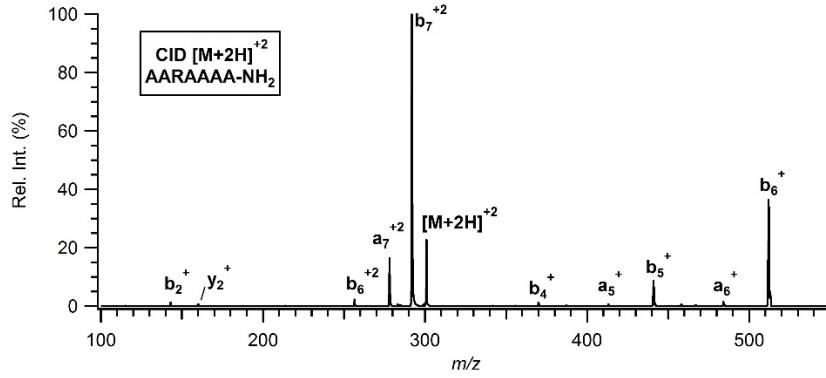
Şekil 16. Çift Protonlu ARAAAAA-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

MS/MS kütle sinyali detaylı incelendiğinde Şekil 15 ve Şekil 16 arasında büyük bir fark görülmektedir. Histidin ihtiva eden peptit serisinde elde edilen sonuçlarla uyumluluk gösteren bu sonuç, Lizin ihtiva eden model peptitte elde edilen sonuçla farklılık göstermektedir. Çifte protonlanmış b_7^{2+} iyonu, en şiddetli sinyal olarak gözlenmektedir.

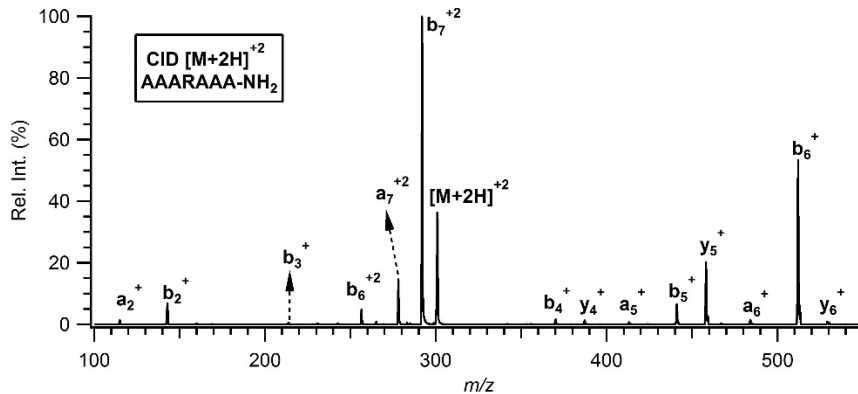
Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, üçüncü sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 17. de verilmektedir.



Şekil 17. Çift Protonlu AARAAA-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

MS/MS kütle sinyali detaylı incelendiğinde, lizin amino asit ihtiva eden model peptit ile benzer sonuç gösterirken, aynı pozisyonda bulunan histidin ihtiva eden peptit serisinden elde edilen sonuç farklıdır. Bunun yanında, lizin ve histidin ihtiva eden peptit serilerindeki aynı pozisyondaki sonuçlar karşılaştırıldığında, b_2 - y_{N-2} ($N=7$) komplementeri iyonları gözlenirken, arjinin serisinde bu iyonlar benzer pozisyonda gözlenememiştir.

Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonundan, dördüncü sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 18. de verilmektedir.



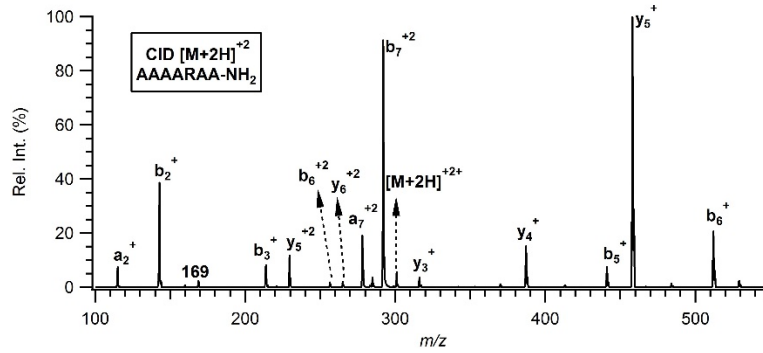
Şekil 18. Çift Protonlu AAARAAA-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

MS/MS kütle spektrumu detaylı incelendiğinde, b_2 - y_{N-2} ($N=7$) komplementeri iyonları, düşük sinyal şiddetinde olsada gözlemlenmiştir. Bunun yanında, peptitlerin parçalanma esnasında oluşturdukları diğer iyon türleride kütle spektrumunda gözlenmektedir. Bu sonuç, aynı pozisyonda bulunan histidinli model peptit ile uyum içindeyken, bu defa da lizin ihtiva eden model peptitden farklı sonuç vermektedir.

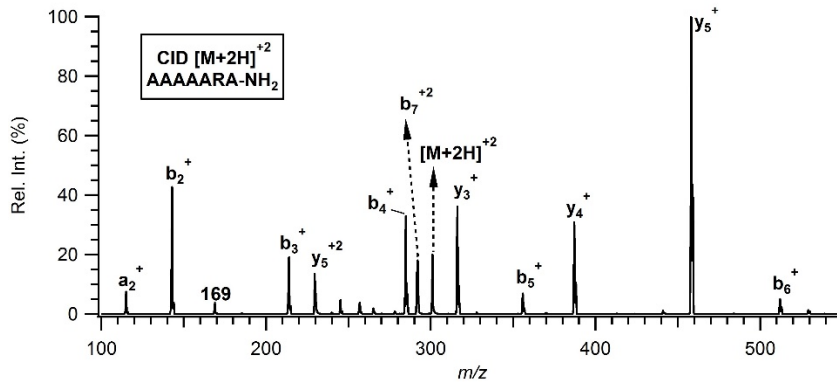
Bazık amino asit, peptit sekansında N-ucu pozisyonundan, beşinci sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 19. de verilmektedir.



Şekil 19. Çift Protonlu AAAAARA-NH₂ model peptitinin CID Kütle Spektrumu

MS/MS kütle spektrumu incelendiğinde, birinci set model peptitden (histidin) ve ikinci set model peptitden (lizin) elde edilen kütle spektrumları büyük oranda benzerlikler göstermektedir. b_2 - y_{N-2} komplementeri iyonları, diğer sonuçlar gibi, benzer sinyal şiddetinde gözlemlenmektedir. Klas 1 iyon türünün (b_2 - y_{N-2} komplementeri iyonları), arjinin amino asidi N-ucuna yaklaştıkça sinyal şiddetini arttırdığı gözlenmiştir.

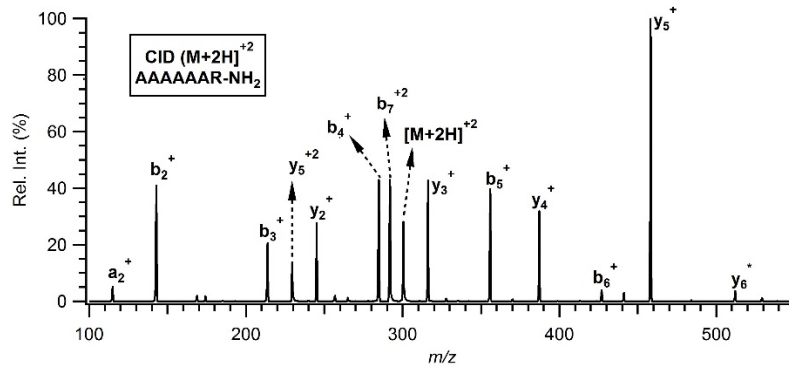
Bazık amino asit, peptit sekansında N-ucu pozisyonundan, altıncı sıraya konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 20. de verilmektedir.



Şekil 20. Çift Protonlu AAAAARA-NH₂ model peptitinin CID Kütle Spektrumu

Bu kütle spektrumunda elde edilen sonuçlarda hem kendi içinde uyumluluk göstermekte hemde diğer sonuçlarla uyum içerisinde görülmektedir. Diğer iyon türlerinde (değişik sinyal şiddetlerinde) kütle spektrumunda gözlenmektedir.

Bazik amino asit, peptit sekansında N-ucunun pozisyonuna konulduğunda yapılan çalışmada elde edilen MS/MS kütle spektrumu Şekil 21. de verilmektedir.



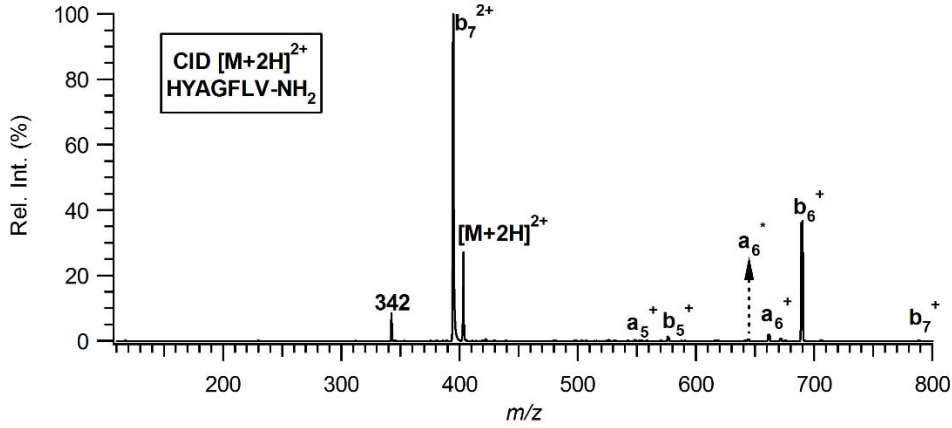
Şekil 21. Çift Protonlu AAAAAAR-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

Arjinin C-ucuna geldiğinde, lizin ve histidin ihtiva eden model peptitlerden farklı olarak, hemen hemen bütün y-iyon türlerinin MS/MS kütle spektrumunda gözlenmesidir. Bunun yanında, b₂-y_{N-2} komplementeri iyonlarından, y_{N-2} (N=7) diğer sonuçlar gibi, en şiddetli sinyal olarak gözlemlenmektedir.

3.4 YAGFLV-NH₂ ve Bir Bazik Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

3.4.1 YAGFLV-NH₂ ve Histidin, H, Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

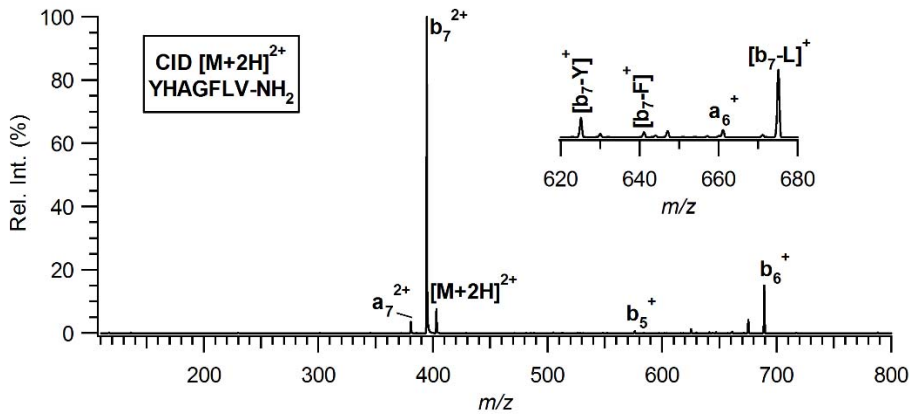
Bu çalışma da, ise, tirozine, Y; alanin, A; gilisine, G; fenilalanin, F; lösin, L; valin, V; amino asitleri kullanılmıştır. Çalışmalar esnasında, XYAGFLV-NH₂, YXAGFLV-NH₂, YAXGFLV-NH₂, YAGXFLV-NH₂, YAGFXLV-NH₂, ve YAGFLVX-NH₂. gibi peptit türevleri kullanılmıştır. X sırasıyla, histidin, H, Lizin, K, ve arjinin, R, amino asitleridir. Şekil 22 de, HYAGFLV-NH₂, model peptiden elde edilen kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 22. Çift Protonlu HYAGFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Çift protonlanmış ana iyonun elde edilen MS/MS kütle sinyalinde çift protonlanmış b_7^{2+} iyonu en şiddetli sinyal olarak gözlenmektedir. Ayrıca, tekli protonlanmış b-iyon serisinde, bu kütle spektrumunda (n= 5-7) gözlenmektedir. y-türü iyon gözlenmemiştir. Bunun sebebi, bazik amino asidin N- ucu pozisyonun da bulunması olduğu düşünülmektedir. İlk rapor döneminde HAAAAA-NH₂ peptit türevinin MS/MS kütle spektrumu ile hemen hemen benzer sonuç gözlenmiştir. Sadece, kütlesi 342 olan bir sinyal farklılık olarak gözlenmiştir.

Şekil 23. de, YHAGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 23. Çift Protonlu YHAGFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

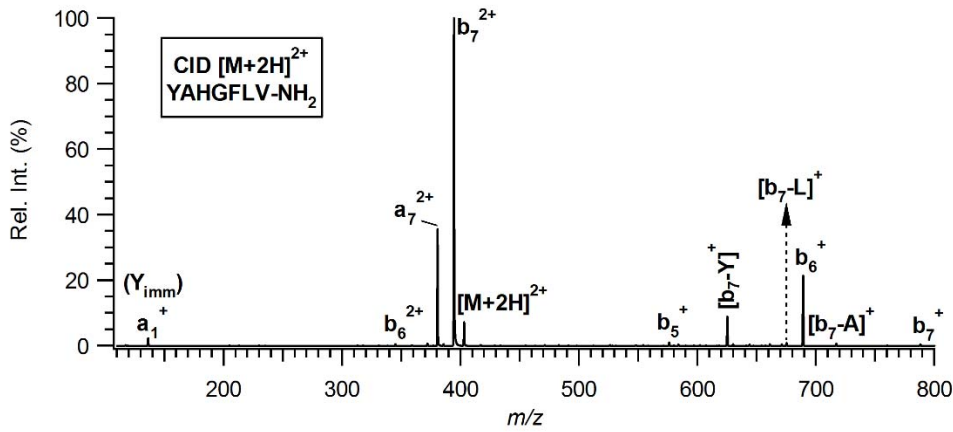
Şekil 22 be Şekil 23 arasında çok büyük bir fark görülmemektedir. Bunu sebebini bazik amino asidin pozisyonunun hala N-ucuna yakın olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle b ve y iyon türleri, yükün C-ucunda veya N-ucunda olmasına göre oluşmaktadır. Ayrıca oluşan iyonun gaz fazı proton afinitesinde hangi tür iyonlar oluşacağını vede sinyal



TÜBİTAK

şiddetlerinin ne olacağını belirlemektedir. Hiç bir γ -türü iyon gözlenememiştir. Alanin'li serinin MS/MS kütle spektrumu ile karşılaştırıldığında, en önemli farkın b_7 iyon türünden tekli amino asit kopmaları gözlenmesidir. Şekil 22 dikkatli olarak incelendiğinde, $[b_7-Y]^+$, $[b_7-F]^+$, ve $[b_7-L]^+$ kopmalarının peptit sekanlaması için detaylı bilgi verdiği gözlenmektedir. Ayrıca, a_7^{2+} iyonu ve tek yüklü b-iyon türleride gözlenmektedir. Alanin ihtiva eden benzer peptit türevi ile karşılaştırıldığında, alanin içeren peptit türevinde, tekli protonlanmış a ve b-iyon türlerinin oluştuğu gözlenmektedir. İki peptit türevi arasında görülen en önemli farklılıklardan birisi bu iyon türleridir.

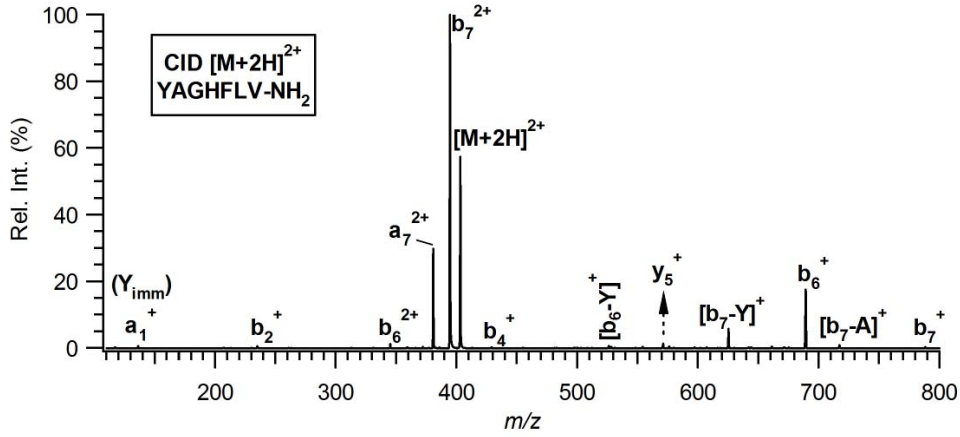
Şekil 24. de, YAHGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 24. Çift Protonlu YAHGFLV-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

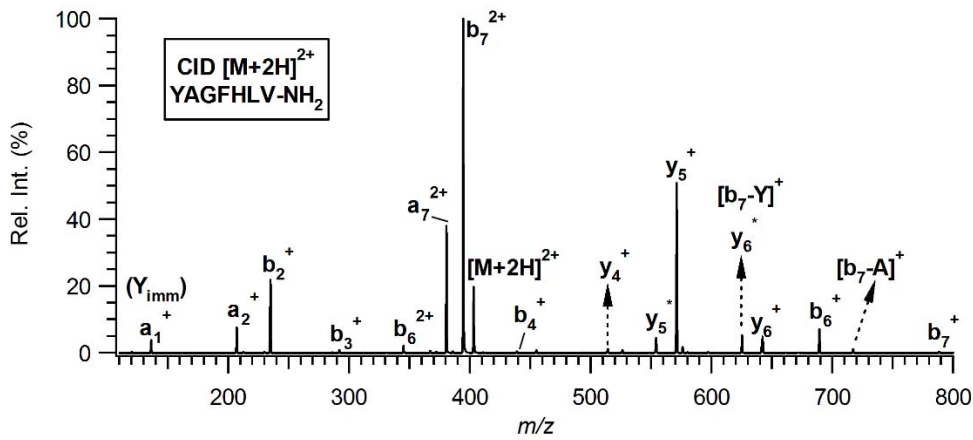
Histidin amino asidinin, N-ucunda, 3.cü pozisyona gelmesi ile, MS/MS kütle spektrumunda iyon sayısı ve çeşitliliğinde artış gözlenmiştir. MS/MS kütle spektrumu incelendiğinde, a_1^+ , b_6^{2+} , ve tekli protonlanmış b-iyon türleri ile birlikte b_7^+ iyonundan tekli amino asit kopmaları gözlenmiştir. Diğer MS/MS kütle sinyallerinde olduğu gibi, burada da en güçlü sinyal olarak b_7^{2+} iyon sinyali gözlenmiştir. Alanin peptit türevi ile karşılaştırıldığında, iyon çeşitliliğinin benzer olduğu görülmektedir. En önemli fark olarak, γ -türü iyonlar gözlenmiş ve Klas 1 tipi parçalanma mekanizması tetiklenmiş ve birbirinin komplementeri olan $b_2^+-y_5^+$ iyon türü en güçlü kütle sinyalinden biri olarak gözlenmiştir. YAHGFLV-NH₂ peptit türevinde ise, Klas 1 parçalanma mekanizması gözlenememiştir. Buda amino asit sekanlarının ve proton afinitilerinin parçalanma mekanizmalarına etkisinin bir göstergesidir.

Şekil 25. de, YAGHFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 25. Çift Protonlu YAGHFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

YAGHFLV-NH₂ peptit türevinde, histidin amino asidin pozisyonu, 4.cü pozisyonda olduğunda, Klas 1 tipi parçalanma mekanizmasının tetiklendiği ve birbirinin komplementeri olan b_2^+ - y_5^+ iyon türü gözlenmiştir. İyon çeşitliliği olarak, hem a-türü, hemde y-türü genel olarak tekli protonlanmış sinyaller olarak gözlenmiştir. Diğer peptit türevlerinde gözlendiği gibi b_7^{2+} iyon türü en güçlü sinyal olarak gözlenirken, tekli protonlanmış b_7^+ iyonundan tekli amino asit eliminasyonları da gözlenmiştir. Alanin peptid türevi ile karşılaştırıldığında birbirlerine benzer oldukları görülmektedir. En belirgin fark, tekli protonlanmış a-iyon türlerinin varlığıdır. Şekil 26. de, YAGFHLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



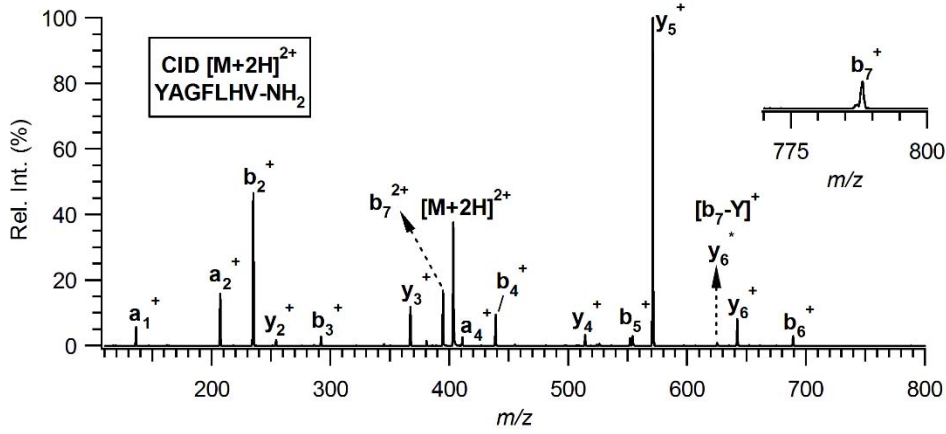
Şekil 26. Çift Protonlu YAGFHLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

Klas 1 tipi parçalanma mekanizmasının ($b_2^+-y_5^+$) MS/MS kütle spektrumunda belirgin bir sinyal artışı görülmüştür. İyon çeşitliliği ve bu iyonların sinyalleri güçlü bir şekilde gözlenmiştir. Klas 1 iyon türü olan ve birbirlerinin koplementeri olan $b_2^+-y_5^+$ iyon türü MS/MS kütle spektrumunda belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Bunun yanında, iyon çeşitliliği olarak, tekli protonlanmış a, b ve y-türü iyon serileri gözlenmiştir. b_7^{2+} iyonu, diğer peptit türevlerinde olduğu gibi genel olarak en güçlü kütle sinyali olarak gözlenmiştir. Alanin peptit türevi ile karşılaştırıldığında, birbirlerine çok benzer bir davranış gösterdikleri gözlenmektedir.

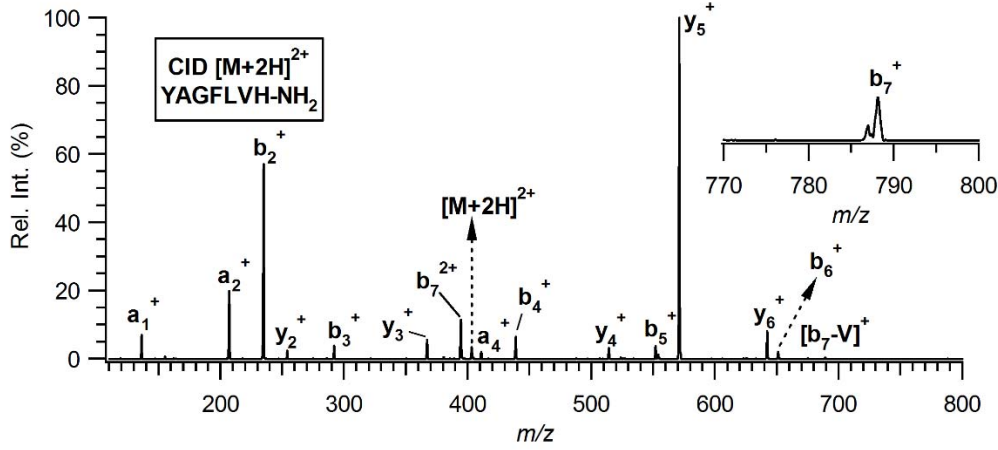
Şekil 27. de, YAGFLHV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 27. Çift Protonlu YAGFLHV-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

Klas 1 parçalanma mekanizması sonucu oluşan $b_2^+-y_5^+$ iyon türü MS/MS kütle spektrumunda en güçlü kütle sinyali olarak gözlenmiştir. Histidin amino asidi, C-ucuna yaklaştıkça Klas 1 tipi parçalanma yolağının, parçalanma mekanizmasında tercih edildiği gözlenmektedir. Bunun yanısıra, a, b ve y- türü iyon serileri, MS/MS kütle sinyalinde gözlenmektedir. Alanin ihtiva eden peptit türevi ile sonuçlar karşılaştırıldığında, birbirlerine çok benzediği görülmektedir.

Şekil 28. de, YAGFLVH-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 28. Çift Protonlu YAGFLVH-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

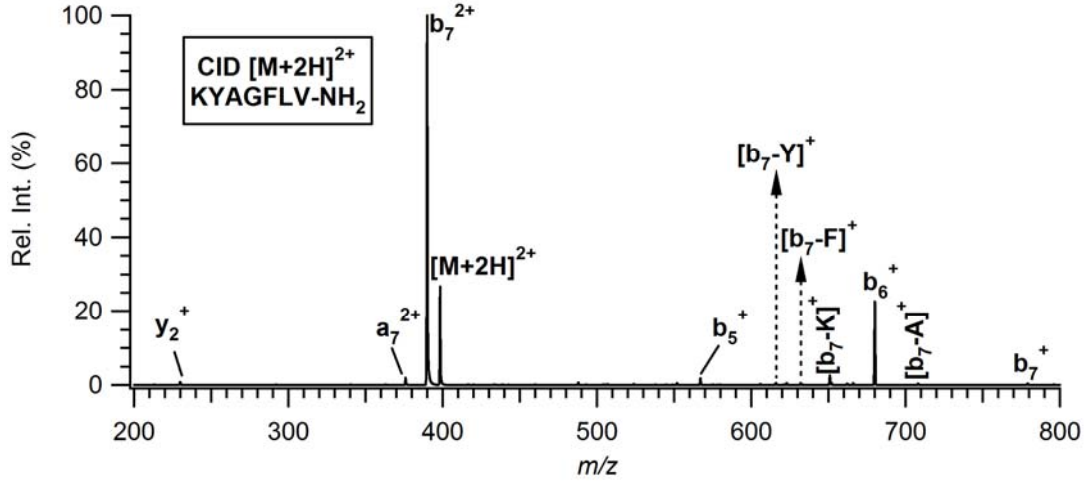
Bu deney sonucunda klas1 parçalanma mekanizması sonucunda oluşan b_2^+ - y_5^+ iyon türü MS/MS kütle spektrumundaki en şiddetli kütle sinyali olarak gözlenmiştir. Bunun yanında, a, b ve y-türü iyon sinyalleride gözlenmiştir. Histidin amino asidi, C-terminal ucuna doğru yaklaştıkça klas 1 parçalanma mekanizması olan, b_2^+ - y_5^+ komplementari iyonları, MS/MS kütle spektrumunda en güçlü kütle sinyali olarak gözlenmiştir. İyon çeşitliliğinin birlikte, a, b ve y-türü iyonlar oluşmuştur. Alanin ihtiva eden peptit türevinde elde edilen kütle spektrumu ile karşılaştırıldığında hemen hemen aynı iyon türleri benzer bir dağılım gözlenmiştir.

3.4.2 YAGFLV-NH₂ ve Lizin,K, Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış

Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

Bu çalışmada, ikinci tür peptit serisi için, KYAGFLV-NH₂, YKAGFLV-NH₂, YAKGFLV-NH₂, YAGXFLV-NH₂, YAGFXLV-NH₂, ve YAGFLVX-NH₂. gibi peptit türevleri kullanılmıştır. Alanin yerine ise, tirozine, Y; alanin, A; glisin, G; fenilalanin, F; lösin, L; valin, V; amino asitleri kullanılmıştır.

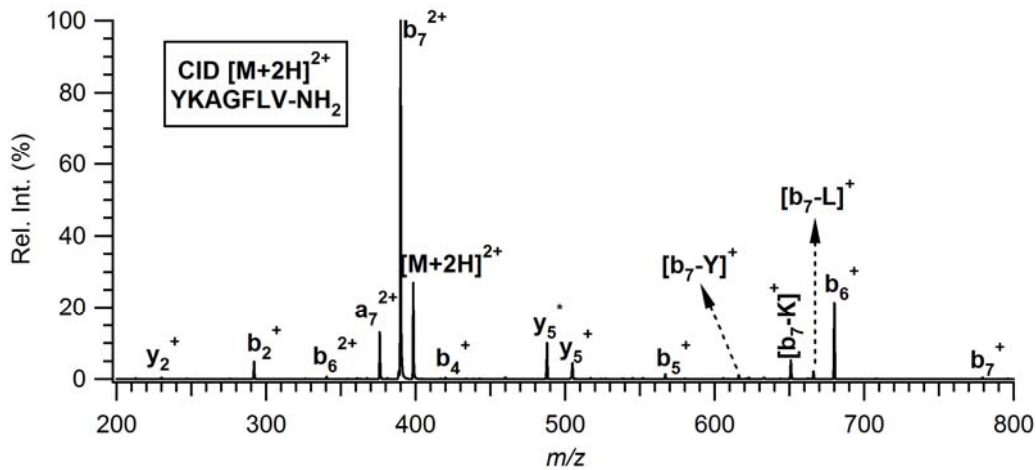
Şekil 29. de, KYAGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 29. Çift Protonlu KYAGFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

KYAGFLV-NH₂ peptidin MS/MS kütle spektrumu incelendiğinde b₇²⁺ kütle sinyalinin en güçlü kütle sinyali olduğu görülmektedir. Bunun yanında, zayıf kütle sinyali olarak b₇⁺- X (X=Y, F, K, ve A) iyonlarında gözlenmiştir. Çifte protonlanmış, a ve y-iyonları ile birlikte, tekli protonlanmış b-türü iyonlarda gözlenmiştir. Alanin ihtiva eden peptit türevi ile karşılaştırıldığında MS/MS kütle sinyallerinde benzerlikler bulunmaktadır.

Şekil 30. da, YKAGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 30. Çift Protonlu YKAGFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

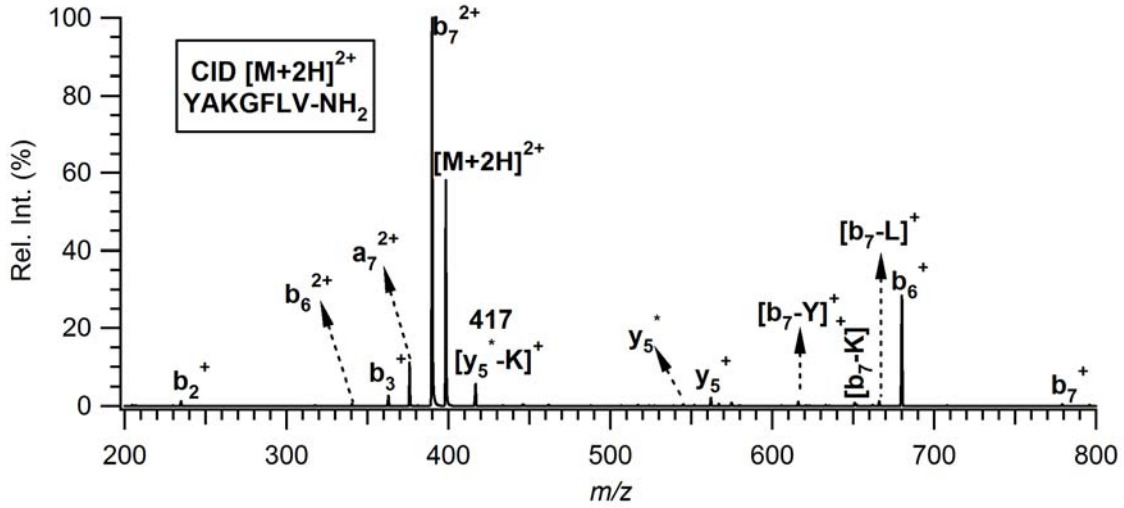
MS/MS kütle spektrumunda en güçlü sinyal olarak b₇²⁺ iyonu gözlenmektedir. Lizin,K, ikinci pozisyona geldiğinde klas 1 parçalanma mekanizması sonucu oluşan b₂⁺-y₅⁺ iyon türü



TÜBİTAK

gözlenmiştir. Bunun yanında, iyon çeşitliliği artmış ve b ve y-türü kütle sinyalleri oluşmuştur. Ayrıca, tekli amino asit kopmalarında, b_7^+-X ($X=Y, L$ ve K), gözlenmiştir. Alanin ihtiva eden benzer peptit türevi ile karşılaştırıldığında birbirlerine benzer oldukları görülmektedir.

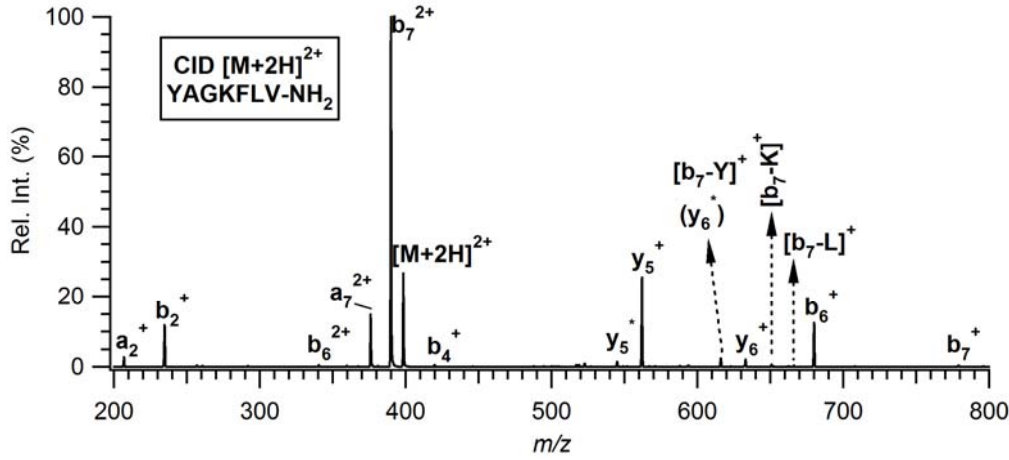
Şekil 31. da, YAKGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 31. Çift Protonlu YAKGFLV-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

Klas 1 tipi parçalanma mekanizması MS/MS kütle spektrumunda gözlenmektedir, fakat, kütle sinyali, lizin pozisyonuna bağlı olarak hala düşük sinyal şiddetinde görülmektedir. Bunun yanında iyon çeşitliliği görülmekte ve genel olarak, b ve y-türü iyonlar gözlenmektedir. Histidin peptit türevlerinde gözlemlendiği gibi, b_7^+ iyon türünden tekli amino asit kopmaları görülmektedir. b_7^{2+} iyon sinyali, en güçlü sinyal olarak gözlenmektedir. Alaninli benzer peptit türevi ile karşılaştırıldığında, benzerlikler gözlenmiştir, fakat, b_7^+-X türü tekli amino asit eliminasyonları, gözlenememiştir.

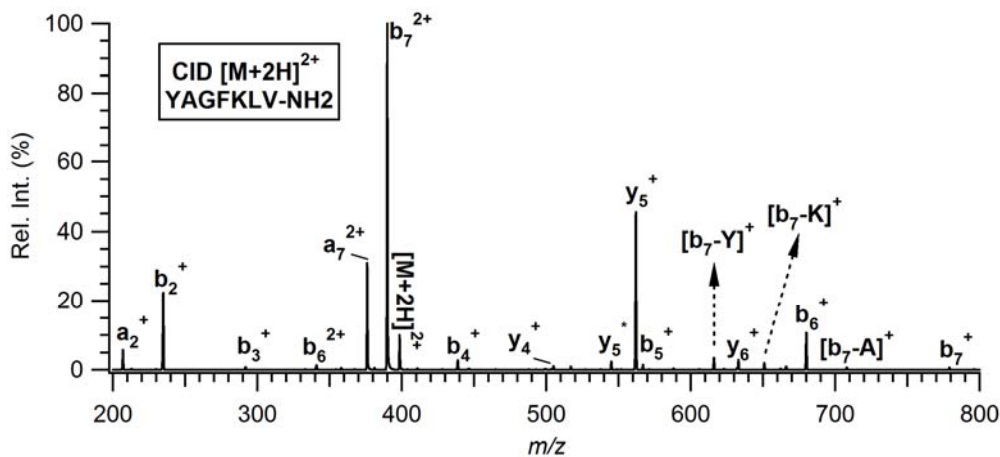
Şekil 32. de, YAKGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 32. Çift Protonlu YAGKFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Pozisyona bağlı olarak, diğer peptit türevlerinde de gözlenen b_7^{2+} en şiddetli iyon sinyali olarak gözlenmektedir. Klas 1 parçalanma mekanizması olan $b_2^+-y_5^+$ iyon türü MS/MS kütle spektrumunda kayda değer sinyal şiddetinde gözlenmiştir. Ayrıca, tekli ve çiftli protonlanmış a ve b-türü iyon sinyalleri yanında, genel olarak gözlenen tekli amino asit kopmaları bu kütle spektrumunda da görülmektedir. Alanin türevi olan benzer peptit türevi ile karşılaştırıldığında, en belirgin fark olarak, klas 1 parçalanma mekanizmasının hemen hemen en güçlü sinyal olduğudur. Bunun yanında, a ve b-türü iyonlar her iki kütle spektrumunda da benzer bir dağılım göstermektedir.

Şekil 33. de, YAGFKLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 33. Çift Protonlu YAGFKLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

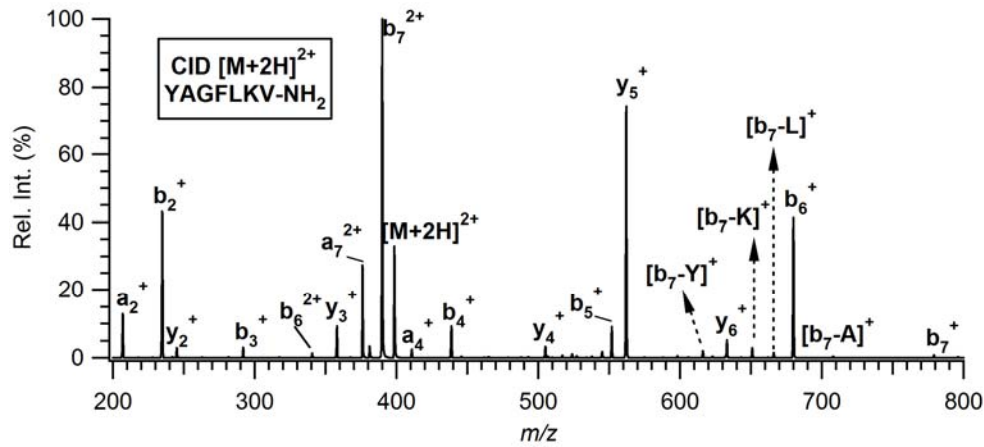
Şekil 32 de de görüleceği üzere, klas 1 türü parçalanma mekanizması, MS/MS kütle spektrumunda en güçlü ikinci iyon türü olarak gözlenmiştir. Bunun yanında tekli ve çiftli



TÜBİTAK

protonlanmış a ve b- iyon türleri gözlenmiştir. Diğer MS/MS kütle spektrumlarında gözlenen tekli amino asit kopmaları burada da görülmüştür. Benzer peptit türevlerinden alaninli olan ile karşılaştırıldığında, bu kütle spektrumunda klas 1 parçalanma mekanizmasının, en güçlü sinyal olduğu görülmektedir. Benzer olarak tekli veya çift protonlanmış a ve b-türü iyonlar benzer dağılım göstermektedir.

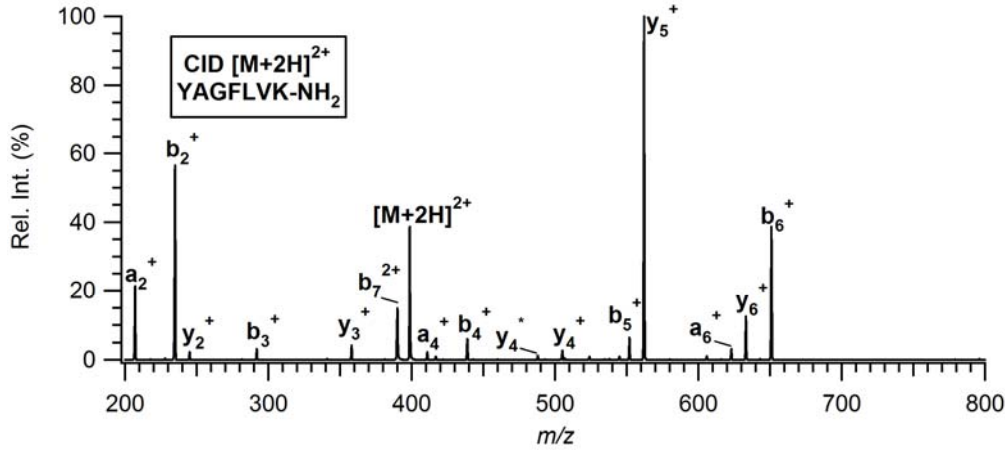
Şekil 34. de, YAGFLKV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 34. Çift Protonlu YAGFLKV-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

MS/MS kütle spektrumunda incelendiğinde iyon çeşitliliği gözlenmektedir. Tekli ve çift protonlanmış a, b ve y-türü iyonlar gözlenmektedir. Hemen hemen her kütle spektrumunda olduğu gibi b₇²⁺ iyonu en güçlü kütle sinyali göstermektedir. Ayrıca, klas 1 tipi parçalanma mekanizması iyon türleride ikinci en güçlü kütle sinyali olarak gözlenmektedir. Benzer peptit türevi olan alanin peptit türevi ile karşılaştırıldığında, en güçlü kütle sinyali olarak klas 1 tipi iyon türü olan, b₂⁺-y₅⁺ iyon türünün olduğu görülmektedir. a-b ve y-türü iyonlar MS/MS kütle spektrumunda benzer bir dağılım göstermiştir.

Şekil 35. de, YAGFLVK-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.

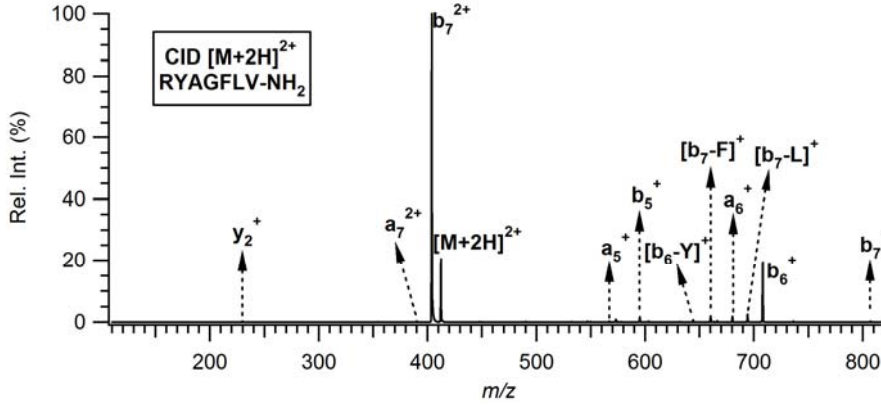


Şekil 35. Çift Protonlu YAGFLVK-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu

Klas 1 parçalanma mekanizması sonucu oluşan b₂⁺-y₅⁺ iyon türü, MS/MS kütle spektrumunda en güçlü kütle sinyali olarak gözlenmektedir. Ayrıca, çoğunlukla tekli yük taşıyan a, b ve y-türü iyon çeşitliliği gözlenmektedir. Benzer peptit türevinin alaninli serisi ile yapılan karşılaştırmada, hemen benzer dağılım gösterdiği görülmüştür.

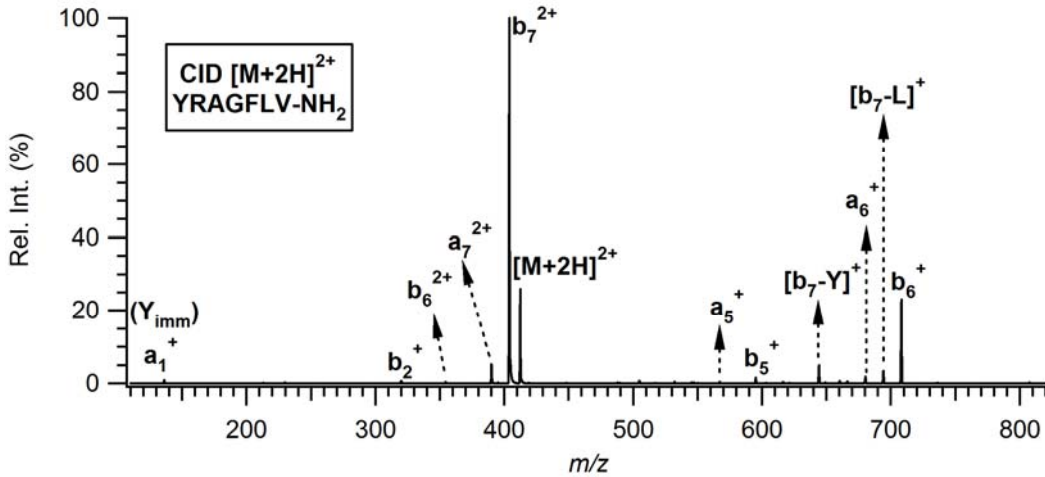
3.4.3 YAGFLV-NH₂ ve Arjinin,R, Amino Asit İçeren Çifte Protonlanmış Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

Bu çalışmada, ikinci tür peptit serisi için, KYAGFLV-NH₂, YKAGFLV -NH₂, YAKGFLV-NH₂, YAGXFLV-NH₂, YAGFXLV-NH₂, ve YAGFLVX-NH₂. gibi peptit türevleri kullanılmıştır. Alanin yerine ise, tirozine, Y; alanin, A; gilisine, G; fenilalanin, F; lösin, L; valin, V; amino asitleri kullanılmıştır. Şekil 36. de, RYAGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir. MS/MS kütle spektrumu incelendiğinde, b₇²⁺ iyonun en güçlü iyon şiddetine sahip olduğu görülmektedir. Diğer peptit türevlerinde de görüldüğü gibi tekli amino asit kopmaları burada da b₇⁺-X (X=Y, F ve L) olarak gözlenmiştir. Ayrıca çoğunlukla tek yüklü, a ve b-türü iyonlar gözlenmiştir. Alanin ihtiva eden türevi ile karşılaştırıldığında benzer davranışlar görülmektedir. Sadece tekli amino asit kopmaları gözlenmemiştir.



Şekil 36. Çift Protonlu RYAGFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

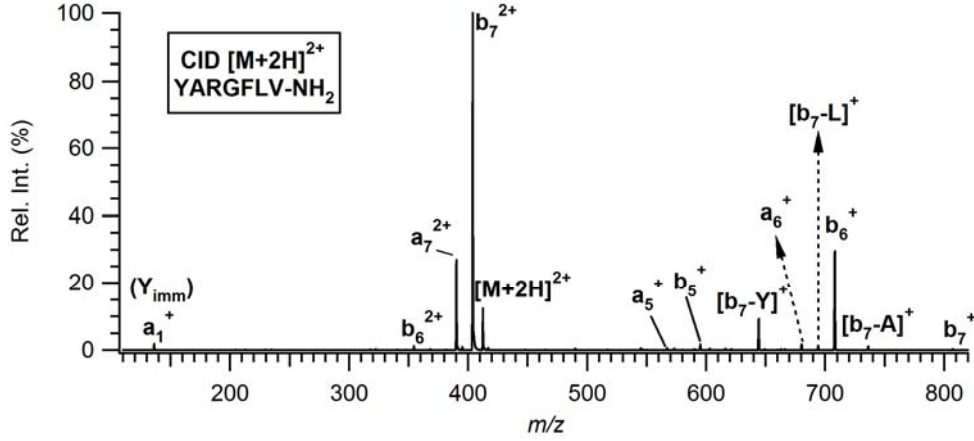
Şekil 37. de, YRAGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 37. Çift Protonlu YRAGFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Tekli ve çift yüklü a ve b-türü iyonlar ile birlikte, tekli amino asit kopmaları bu MS/MS kütle spektrumunda da gözlenmiştir. En güçlü kütle sinyali olarak her zamanki gibi, b_7^{2+} iyonu gözlenmektedir. Alanin ihtiva eden peptit türevi ile karşılaştırıldığında benzer MS/MS kütle spektrumu gözlenmektedir. Alaninli peptit türevinde, tekli amino asit kopmaları gözlenmemiştir. En belirgin farklılık burada gözlenmektedir.

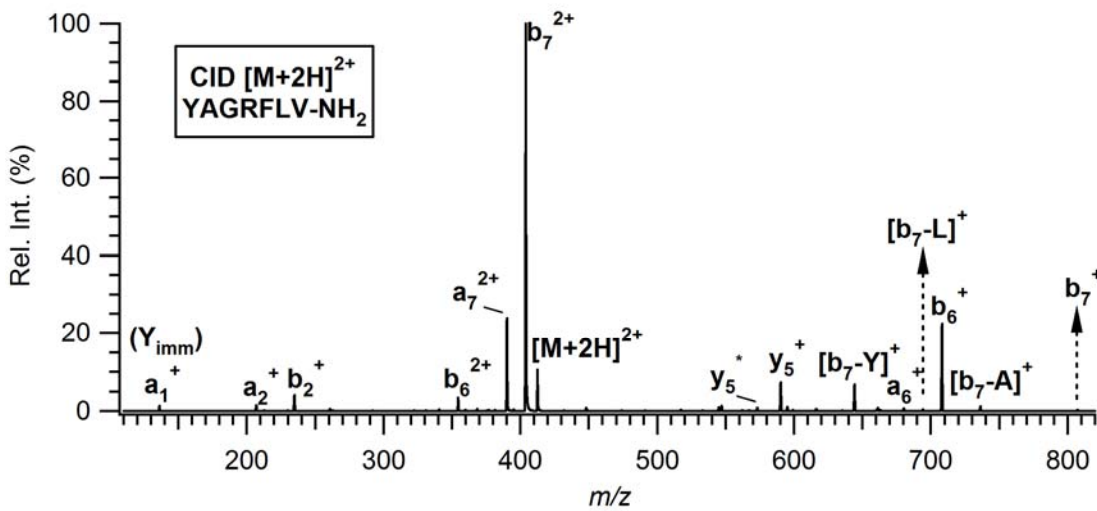
Şekil 38. de, YARGFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



Şekil 38. Çift Protonlu YARGFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Şekil deaylı incelendiğinde, bir önceki sonuç ile hemen hemen aynı davranışı gösterdiği görülmektedir. Tekli ve çift yüklü a ve b-türü iyonlar ile birlikte, tekli amino asit kopmaları MS/MS kütle spektrumunda da gözlenmektedir. En güçlü kütle sinyali olarak her zamanki gibi, b₇²⁺ iyonu gözlenmektedir. Alanin ihtiva eden benzer peptit türevi ile karşılaştırıldığında, klas 1 iyon türü orada gözlenirken, bu MS/MS kütle sinyalında gözlenmemiştir. Diğer iyon türleri dağılımları göz önüne alındığında, benzerlikler görülmektedir.

Şekil 39. de, YAGRFLV-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir



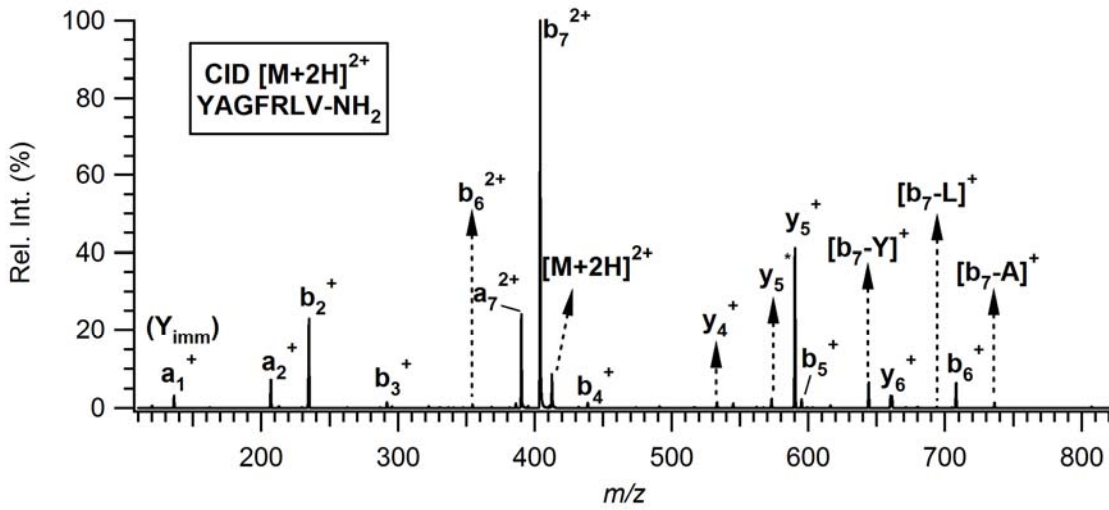
Şekil 39. Çift Protonlu YAGRFLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

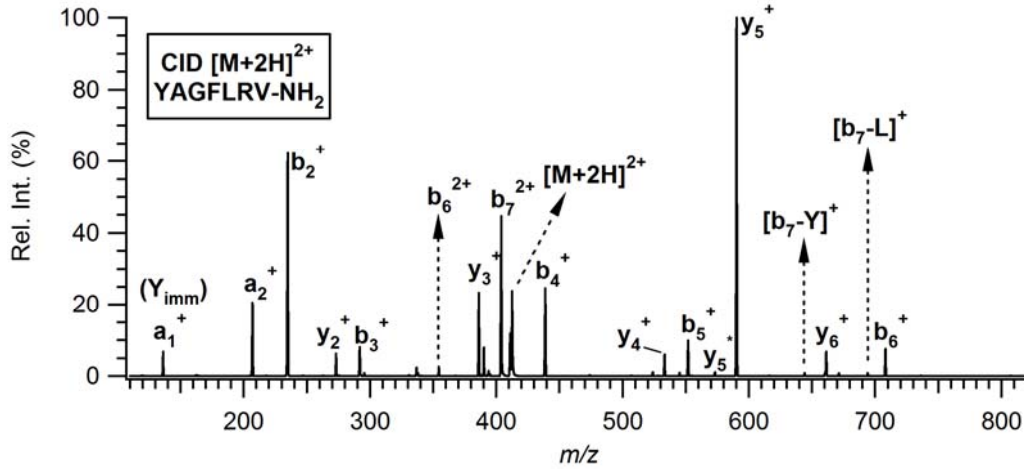
Klas 1 parçalanma ürünü olan $b_2^+-y_5^+$ iyon türü gözlenmeye başlanmıştır. İyon çeşitliliği artmış ve genel olarak tekli ve çift yüklü a, b ve y-türü iyonlar gözlenmiştir. b_7^+ iyonundan, tekli amino asit kopmaları görülmüştür. b_7^{2+} iyonu, en güçlü kütle sinyali olarak gözlenmektedir. Aynı serinin alanin türevi ile karşılaştırıldığında, birbirine çok benzer oldukları görülmektedir. En belirgin fark, tekli amino asit kopmaları gözlenmemesidir.

Şekil 40. da, YAGFRLV-NH₂ model peptiden elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir.



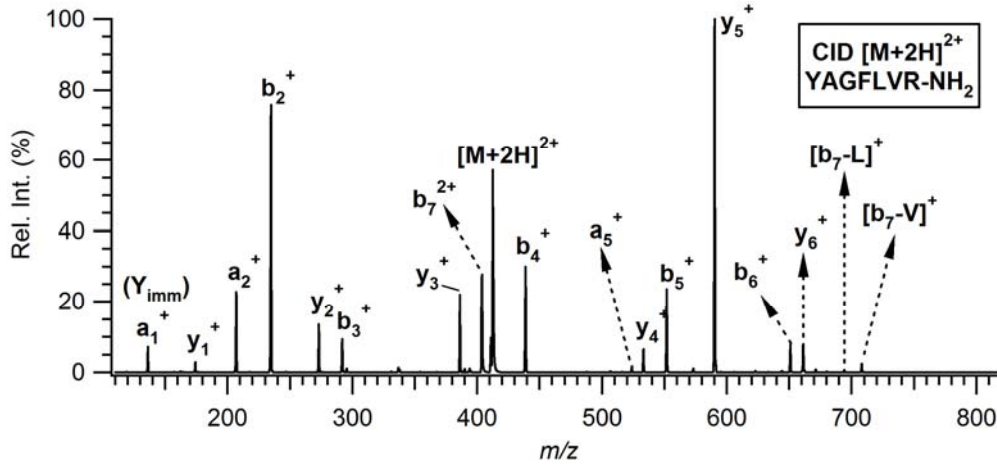
Şekil 40. Çift Protonlu YAGFRLV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Şekil 41. de, YAGFLRV-NH₂ model peptiden elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir. İyon çeşitliliği ile birlikte, iyonların şiddetinde artışlarda görülmektedir. Klas 1 $b_2^+-y_5^+$ iyon türü MS/MS kütle spektrumundaki en güçlü sinyal konumundadır. Genel olarak, a, b ve y-türü iyonlar gözlenmektedir. Yük dağılımı daha çok tekli olarak gözlenmesinde, çift yüklü iyonlarda mevcuttur. Tekli amino asit kopmalarında görülmektedir. Alanin serili peptit türevi ile karşılaştırıldığında, birbirlerine çok yakın MS/MS kütle spektrumları görülmektedir. En belirgin fark, tekli amino asit kopmalarının alaninli peptit türevinde gözlenmemesidir.



Şekil 41. Çift Protonlu YAGFLRV-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Şekil 42. de, YAGFLVR-NH₂ model peptitten elde edilen MS/MS kütle spektrumu verilmektedir

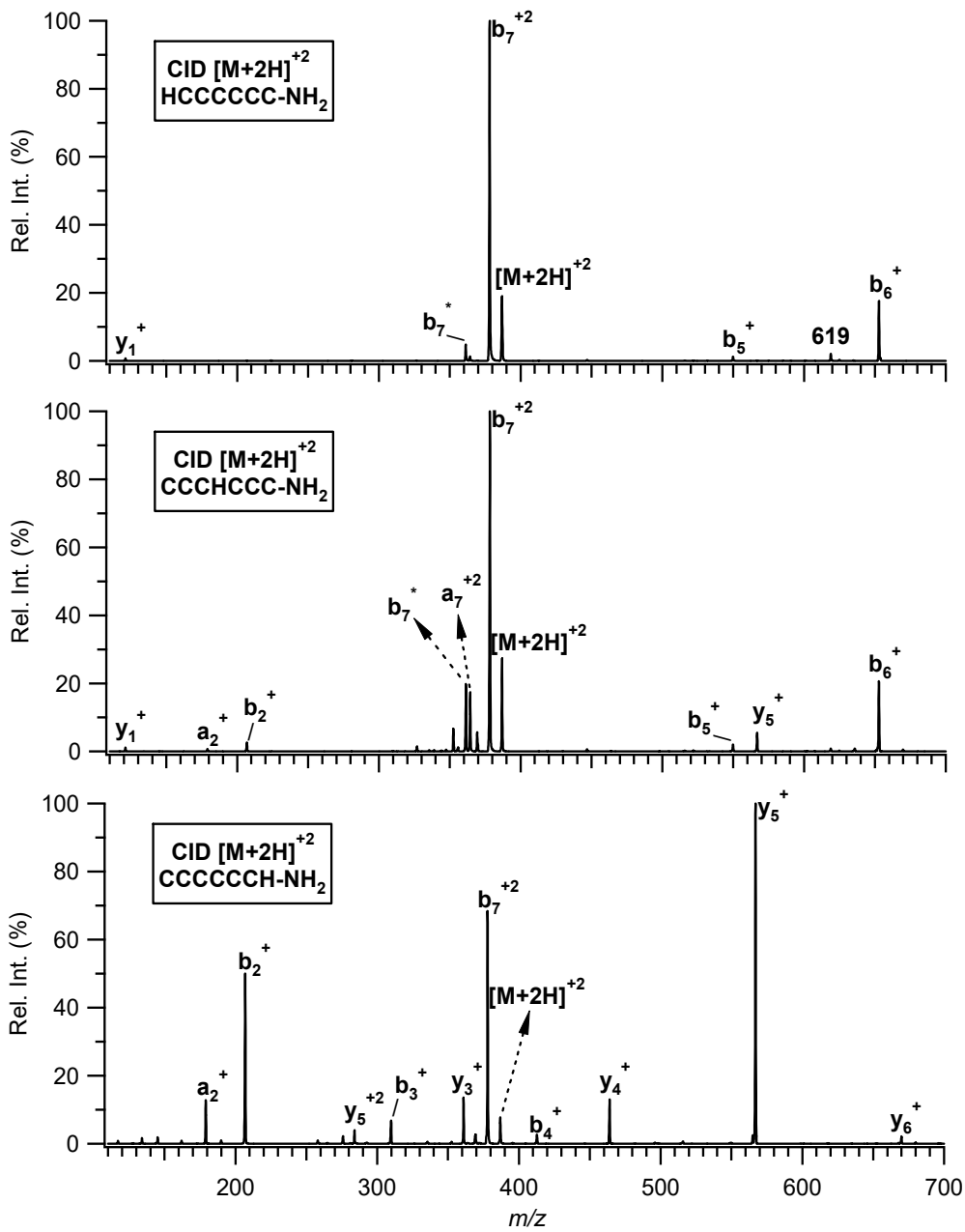


Şekil 42. Çift Protonlu YAGFLVR-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu

Arjinin amino asiti C-ucuna geldiğinde, çoklukla, b ve y-türü iyon türleri görülmektedir. Klas 1 b₂⁺-y₅⁺ iyon türü MS/MS kütle spektrumundaki en güçlü kütle sinyali konumdadır. b₇⁺ iyonundan, tekli amino asit kopmaları gözlenmiştir. İyonların kütle sinyalleri şiddetinde belirgin bir artış bulunmaktadır. Aynı peptit türevinin, alaninli serisi göz önüne alındığında, hemen hemen benzer MS/MS kütle sinyali gözlenmektedir. Tek fark, alaninli seride, tekli amino asit kopmalarının gözlenmemesidir.

3.5 Çifte Protonlanmış HXXXXXX-NH₂, XXXHXXX-NH₂, XXXXXXH-NH₂ (X=C, F, G, L, M, V, Y, S, T) Hepta Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonları

3.5.1 Çifte Protonlanmış HCCCCC-NH₂, CCCHCCC-NH₂, ve CCCCCCH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi



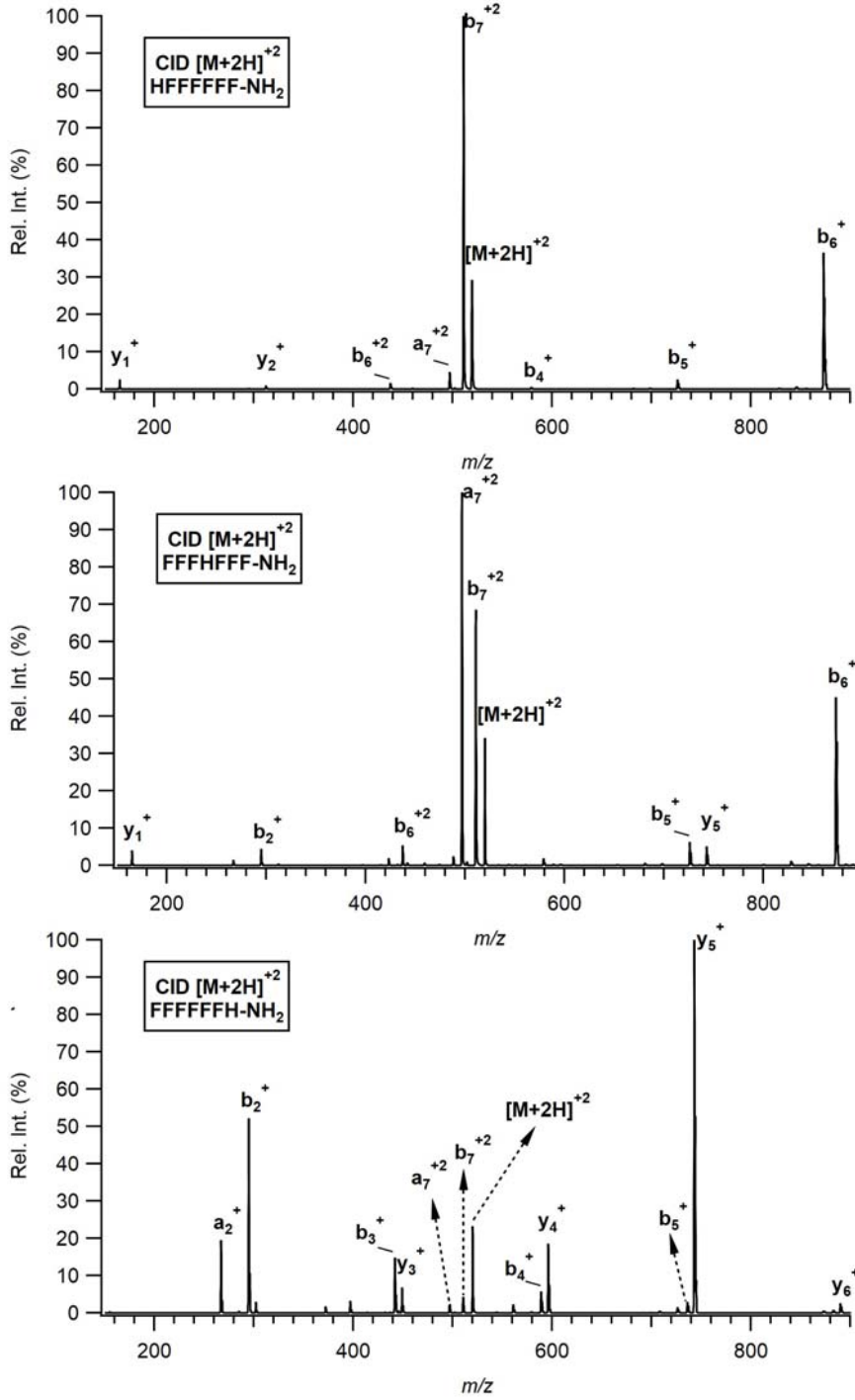
Şekil 43. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden CCCCC-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin,H, ihtiva eden ve altı tane Sistine,C, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 43 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak $b_{7^{2+}}$ iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan $b_{2-y_{N-2}}$ ($b_{2^+}-y_{5^+}$) türü gözlenememiştir. Bunların yanında, küçük şiddette, tek yüklü iyon türlerinden, y_1^+ , b_5^+ ve b_6^+ iyonları gözlenmiştir., Aynı serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, aynı şekilde en şiddetli sinyal olarak $b_{7^{2+}}$ iyonu gözlenmiş; bunun yanında, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan $b_{2-y_{N-2}}$ ($b_{2^+}-y_{5^+}$) iyonları da gözlenmeye başlanmıştır. Ayrıca, y_1^+ , a_2^+ , $a_{7^{2+}}$, b_5^+ , ve b_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu CID kütle spektrumunda ki en şiddetli iyon olarak gözlenmiştir. Diğer klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddetide %50 nin üzerinde gözlenmiştir. Ayrıca, a_2^+ , y_5^{2+} , b_3^+ , y_3^+ , b_4^+ , y_4^+ , ve y_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Diğer model peptitlerde gözlenen iyon türleri burada da gözlenmiştir. Belirgin bir fark gözlenmemiştir.

3.5.2 Çifte Protonlanmış HFFFFFF-NH₂, FFFHFFF-NH₂, ve FFFFFFFH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

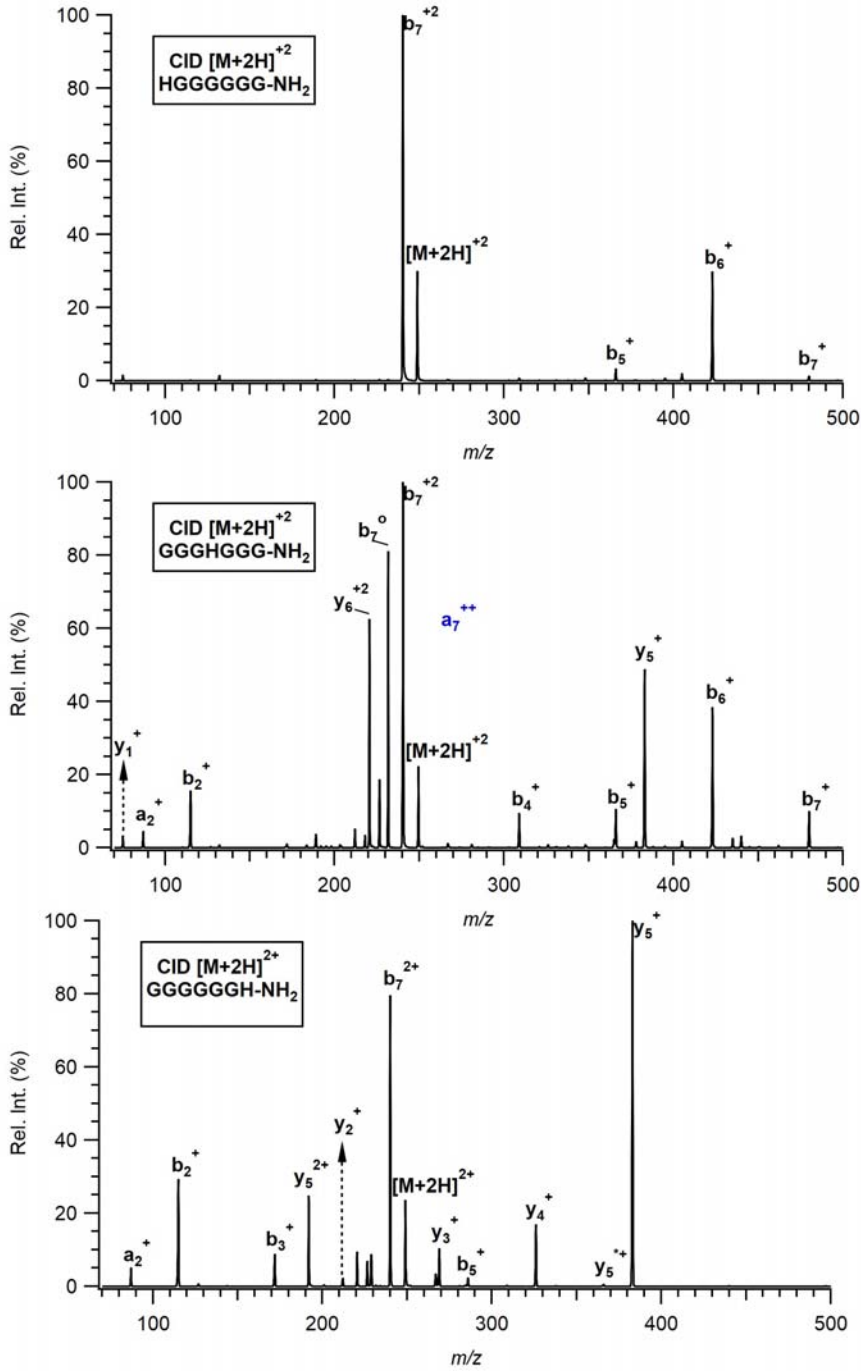


Şekil 44. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden FFFFFFF-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu



N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin,H, ihtiva eden ve altı tane Fenil alanin,F, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 44 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) türü gözlenmemiştir. Bunların yanında, küçük şiddette, tek yüklü iyon türlerinden, y_1^+ , y_2^+ , b_6^{2+} , a_7^{2+} ve b_4^+ , b_5^+ ve b_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Aynı serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, bu defa en şiddetli sinyal olarak a_7^{2+} iyonu gözlenmiştir; bunun yanında, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) iyonları da gözlenmeye başlanmıştır. Ayrıca, y_1^+ , b_6^{2+} , b_7^{2+} , b_5^+ ve b_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu CID kütle spektrumunda ki en şiddetli iyon olarak gözlenmiştir. Diğer klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddetide %50 nin üzerinde gözlenmiştir. Ayrıca, a_2^+ , b_3^+ , y_3^+ , a_7^{2+} , b_7^{2+} , b_4^+ , y_4^+ , b_5^+ ve y_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Bu üçlü serideki en önemli fark, histidine amino asiti, orta pozisyona geldiğinde gözlenmiş olan ve en güçlü iyon şiddetine sahip olan a_7^{2+} iyonunun gözlenmesidir ve diğer hiç bir peptit serisinde gözlenmemiştir. Bunun dışında, diğer model peptitlerde gözlenen iyon türleri burada da gözlenmiştir.

3.5.3 Çifte Protonlanmış HGGGGGG-NH₂, GGGHGGG-NH₂, ve GGGGGGH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi



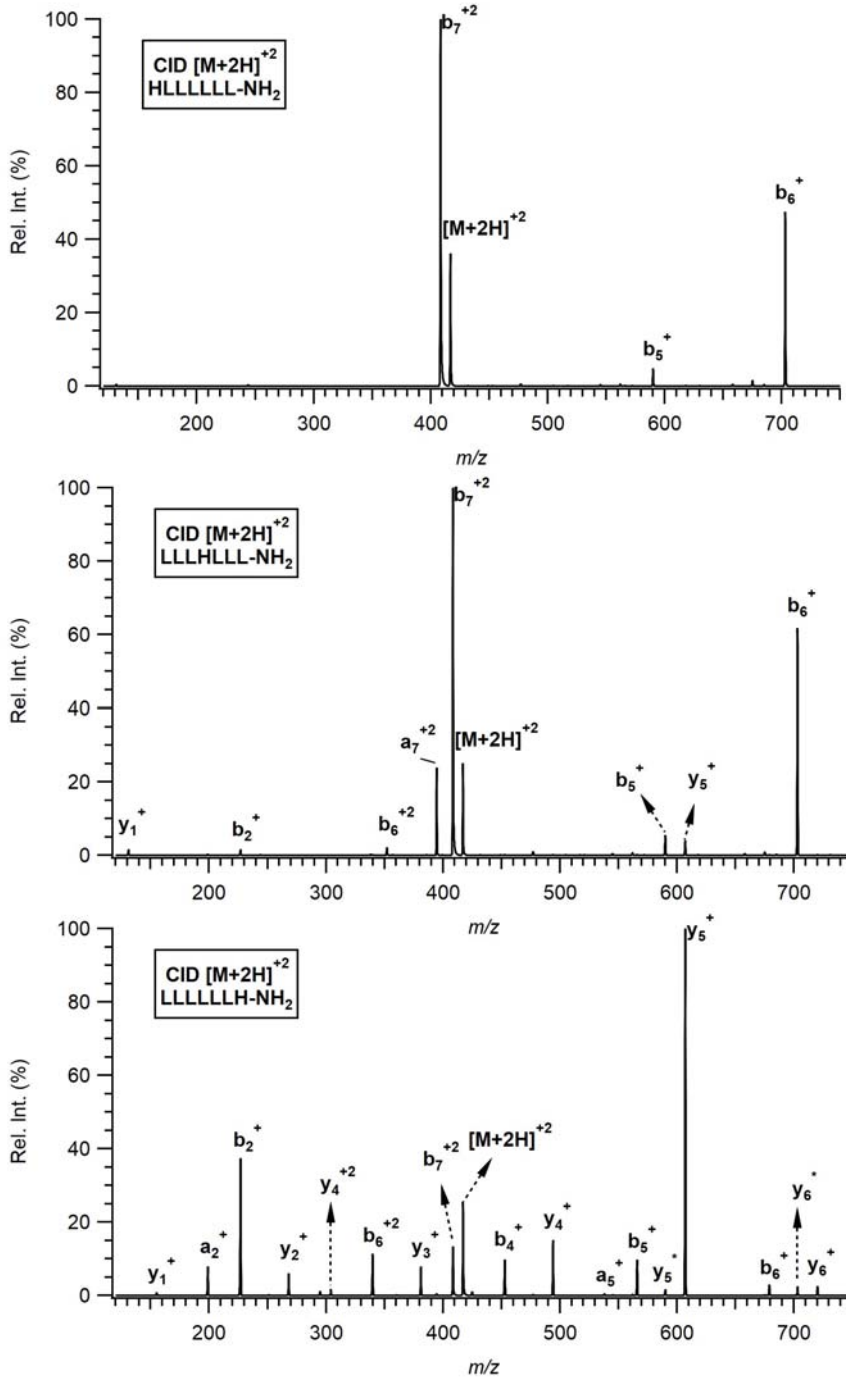
Şekil 45. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden GGGGGG-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin,H, ihtiva eden ve altı tane glisin,G, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 45 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) türü gözlenememiştir. Bunların yanında, küçük şiddette, tek yüklü iyon türlerinden, b_5^+ , b_6^+ , ve b_7^+ iyonları da gözlenmiştir. Aynı serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözlenmiştir; ayrıca, bu iyondan su kopması neticesinde oluşan b_7^0 iyonunda ikinci en şiddetli iyon olarak gözlenmiştir. Ek olarak, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) iyonları da gözlenmiştir. Ayrıca, y_1^+ , a_2^+ , y_6^{2+} , b_4^+ , b_5^+ , y_5^+ b_6^+ ve b_7^+ iyonlarında gözlenmiştir. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu CID kütle spektrumunda ki en şiddetli iyon olarak gözlenmiştir. Diğer klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddetide %30 un üzerinde gözlenmiştir. ikinci en şiddetli iyon sinyali olarak b_7^{2+} gözlenmiştir. Ayrıca, a_2^+ , b_3^+ , y_5^{2+} , y_2^+ , y_3^+ , b_5^+ , ve y_4^+ , iyonlarında gözlenmiştir. Bu üçlü serideki en önemli fark, histidine amino asiti, orta pozisyona geldiğinde gözlemiş olan ve en güçlü ikinci iyon şiddetine sahip olan b_7^0 iyonu ile birlikte gözlenen ve üçüncü en şiddetli iyon sinyali olan y_6^{2+} iyonunun gözlenmesidir.

3.5.4 Çifte Protonlanmış HLLLLLL-NH₂, LLLHLLL-NH₂, ve LLLLLLH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

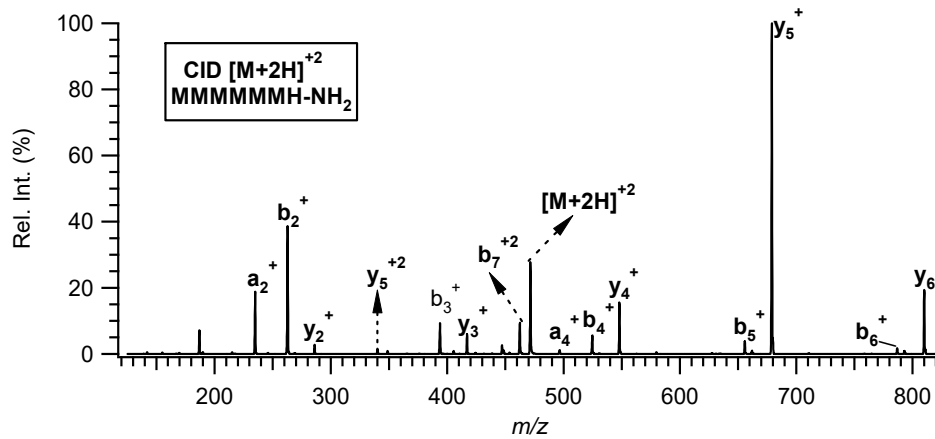
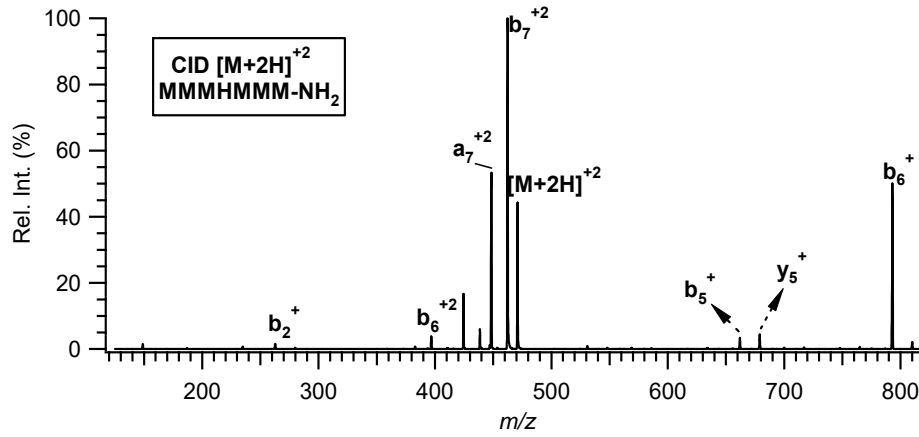
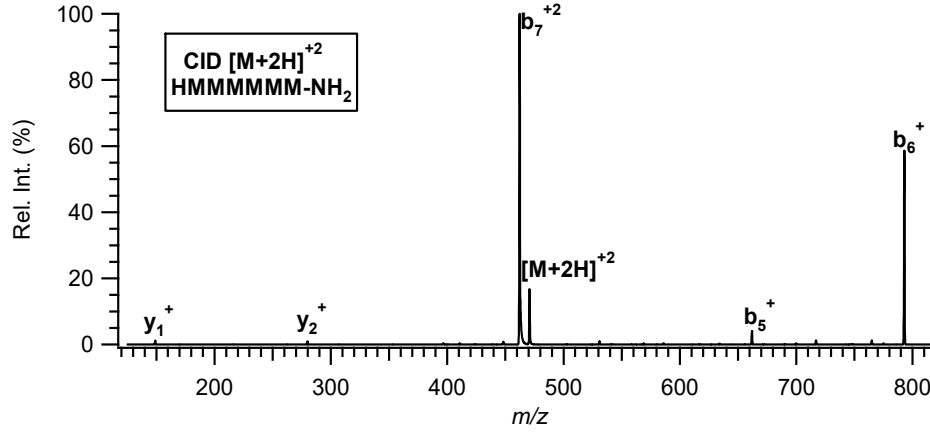


Şekil 46. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden LLLLLL-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu



N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin,H, ihtiva eden ve altı tane lösin,L, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 46 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) türü gözlenememiştir. Bunların yanında, tek yüklü iyon türlerinden, b_5^+ ve b_6 gözlenmiştir. Aynı serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözlenmiştir; ayrıca, b_6^+ iyonuda ikinci en şiddetli iyon olarak gözlenmiştir. Ek olarak, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) iyonları da gözlenmiştir. Ayrıca, y_1^+ , b_6^{2+} , a_7^{2+} , b_5^+ , ve b_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu CID kütle spektrumunda ki en şiddetli iyon olarak gözlenmiştir. Diğer klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddetide %40 civarında gözlenmiştir. ve ikinci en şiddetli iyon sinyali olarak gözlenmiştir. Ayrıca, y_1^+ , a_2^+ , y_2^+ , y_4^{2+} , b_6^{2+} , y_3^+ , b_7^{2+} , b_4^+ , b_5^+ , b_6^+ ve y_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Diğer sonuçlardan farklı olarak y_6^+ ve y_5^+ iyonlarından NH_3 eliminasyonu olarak gözlenen y_5^+ ve y_6^+ iyonları da gözlenmiştir.

3.5.5 Çifte Protonlanmış HMMMMMM-NH₂, MMMHMMM-NH₂, ve MMMMMMMH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi



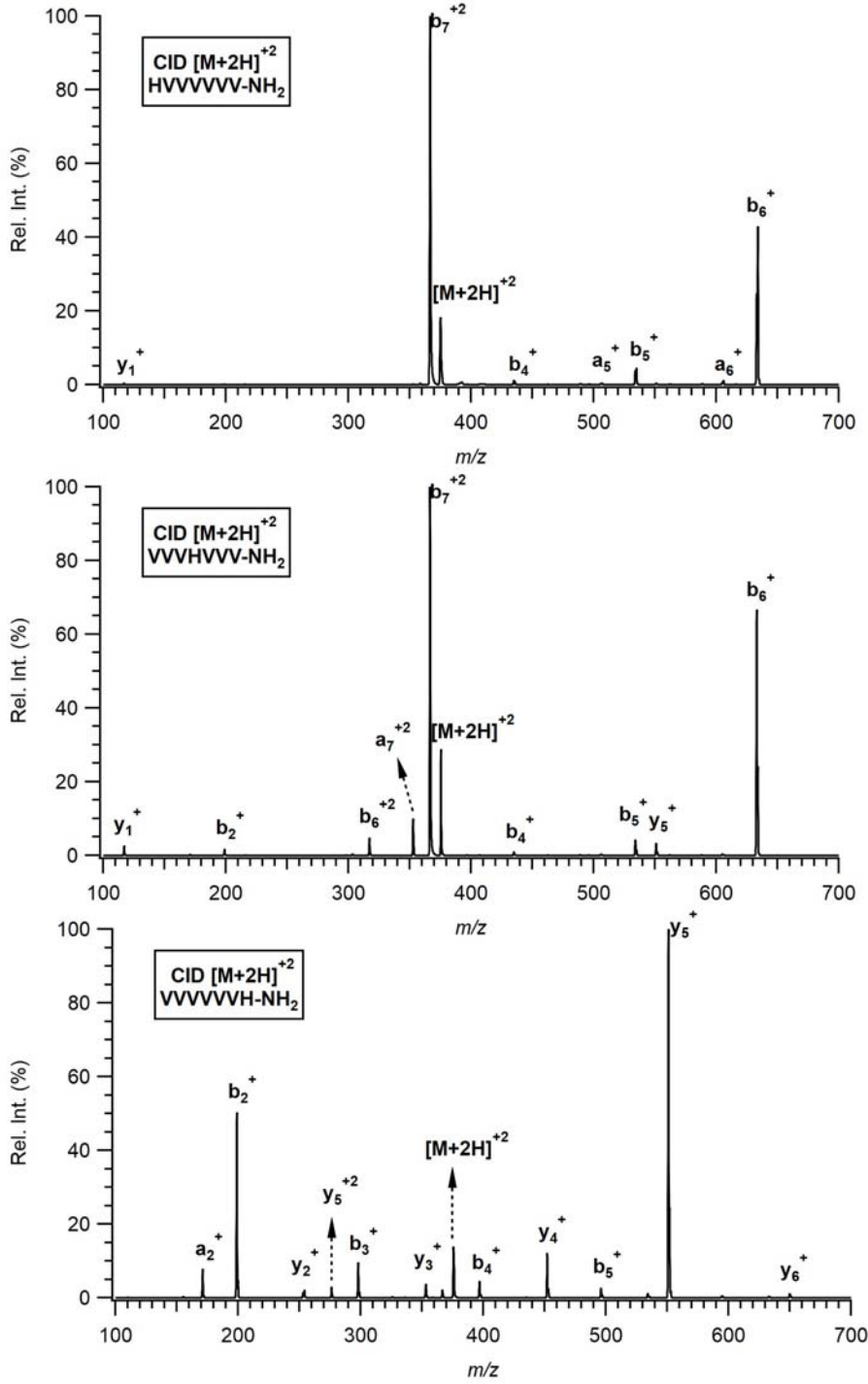
Şekil 47. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden MMMMMMM-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin,H, ihtiva eden ve altı tane Metionin,M, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 47 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) türü gözlenememiştir. Bunların yanında, tek yüklü iyon türlerinden, y_1^+ , y_2^+ , b_5^+ ve b_6^+ gözlenmiştir. Aynı serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, en şiddetli sinyal olarak aynı şekilde b_7^{2+} iyonu gözlenmiştir; ayrıca, a_7^{2+} ve b_6^{2+} iyonları da gözlenmiştir. Ek olarak, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) iyonları da iyon şiddetleri zayıf da olsa gözlenebilmiştir. Ayrıca, b_6^{2+} , a_7^{2+} , b_5^+ , ve b_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu CID kütle spektrumunda ki en şiddetli iyon olarak gözlenmiştir. Diğer klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddetide %40 civarında gözlenmiştir. ve ikinci en şiddetli iyon sinyali olarak gözlenmiştir. Ayrıca, a_2^+ , y_2^+ , y_5^{2+} , b_6^{2+} , y_3^+ , b_7^{2+} , a_4^+ , b_4^+ , y_4^+ b_5^+ b_6^+ ve y_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Beklenildiği gibi klas 1 türü iyonlar son CID spektrumunda en şiddetli iyonlar olarak gözlenmiştir.

3.5.6 Çifte Protonlanmış HVVVVVV-NH₂, VVVHVVV-NH₂, ve VVVVVVH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi



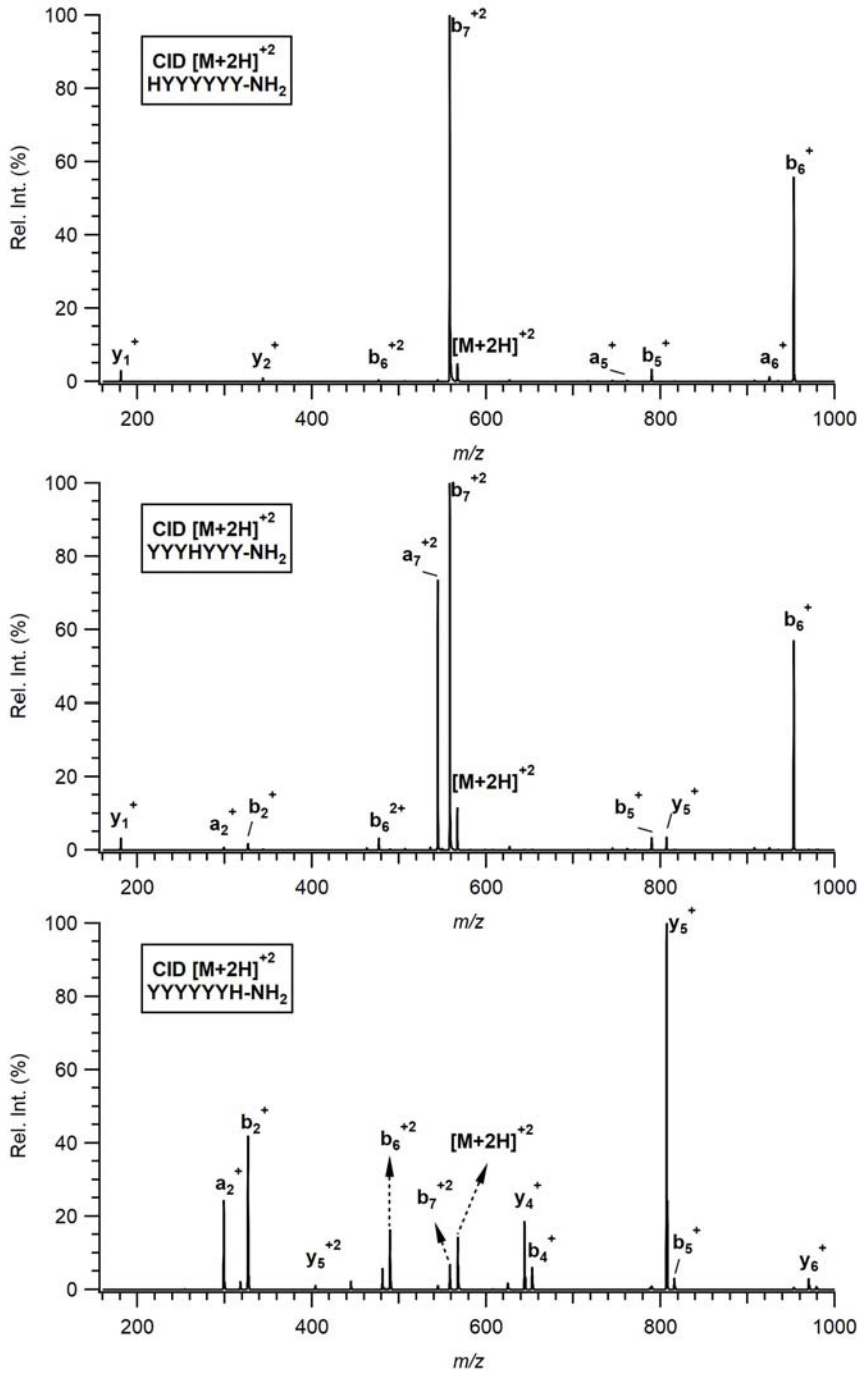
Şekil 48. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden VVVVVV-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin,H, ihtiva eden ve altı tane valine,V, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 48 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan $b_{2-y_{N-2}}$ ($b_2^+-y_5^+$) türü gözlenememiştir. Bunların yanında, tek yüklü iyon türlerinden, y_1^+ , b_4^+ , a_5^+ , b_5^+ , a_6^+ ve b_6^+ iyonları gözlenmiştir. Aynı serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, en şiddetli sinyal olarak aynı şekilde b_7^{2+} iyonu gözlenmiştir; ayrıca, a_7^{2+} ve b_6^{2+} iyonları da gözlenen iyonlardır. Ek olarak, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan $b_{2-y_{N-2}}$ ($b_2^+-y_5^+$) iyonları da iyon şiddetleri zayıf da olsa görülmeye başlanmıştır. Ayrıca, y_1^+ , b_4^+ , b_5^+ , ve b_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu CID kütle spektrumunda ki en şiddetli iyon olarak gözlenmektedir. Diğer klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddetide %50 civarındadır ve ikinci en şiddetli iyon sinyali olarak belirlenmiştir. Tek yüklü iyonlardan a_2^+ , y_2^+ , y_5^{2+} , b_3^+ , y_3^+ , b_4^+ , y_4^+ b_5^+ ve y_6^+ iyonları da CID spektrumunda mevcuttur. Beklenildiği gibi klas 1 türü iyonlar son CID spektrumunda en şiddetli iyonlar olarak gözlenmiştir.

3.5.7 Çifte Protonlanmış HYYYYYY-NH₂, YYYHYYY-NH₂, ve YYYYYYH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi



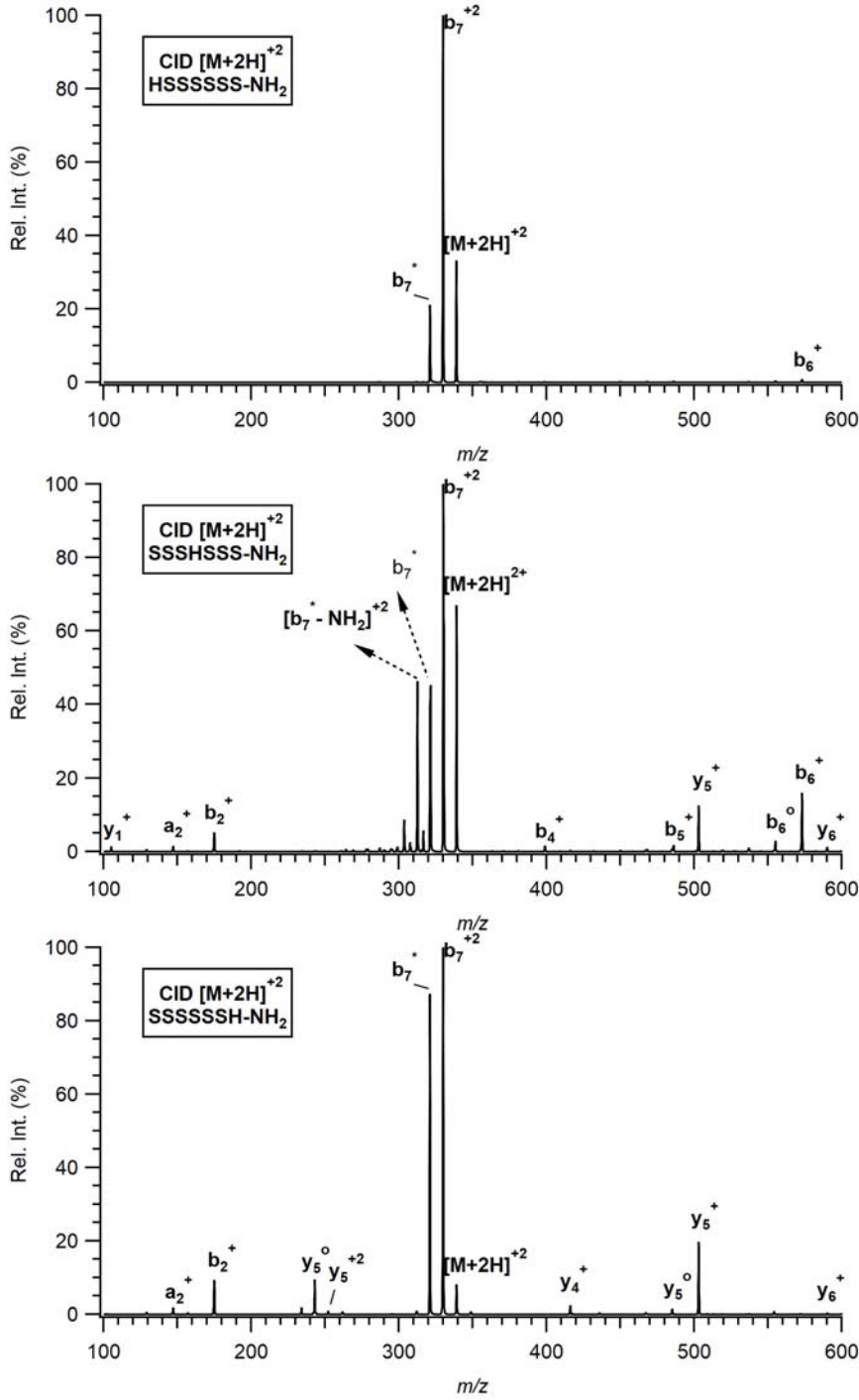
Şekil 49. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden YYYYYY-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin, H, ihtiva eden ve altı tane valine, Tirozin, Y, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 49 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan $b_{2-y_{N-2}}$ ($b_2^+-y_5^+$) türü gözlenmemektedir. Bunların yanında, tek yüklü iyon türlerinden, y_1^+ , y_2^+ , b_5^+ , a_6^+ ve b_6^+ iyonları mevcuttur. Bu serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, en şiddetli sinyal olarak, b_7^{2+} iyonu gözlenmektedir; ayrıca, a_7^{2+} iyonu en şiddetli ikinci iyon olarak gözlenmektedir. Ek olarak, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan $b_{2-y_{N-2}}$ ($b_2^+-y_5^+$) iyonları da iyon şiddetleri zayıf da olsa mevcuttur. Ayrıca, y_1^+ , a_2^+ , b_6^{2+} , b_5^+ , ve b_6^+ iyonları CID spektrumunda oluşan diğer iyon türleridir. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu CID kütle spektrumunda ki en şiddetli iyon olarak gözlenmiştir. Diğer klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddetide %50 civarındadır. ve ikinci en şiddetli iyon sinyali olarak belirlenmiştir. Ayrıca, a_2^+ , y_5^{2+} , b_6^{2+} , y_4^+ , b_4^+ , y_4^+ , b_5^+ ve y_6^+ iyonları da gözlenmiştir. Beklenildiği gibi klas 1 türü iyonlar son CID spektrumunda en şiddetli iyonlar olarak görülmektedir.

3.5.8 Çifte Protonlanmış HSSSSS-NH₂, SSSHSSS-NH₂, ve SSSSSSH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi

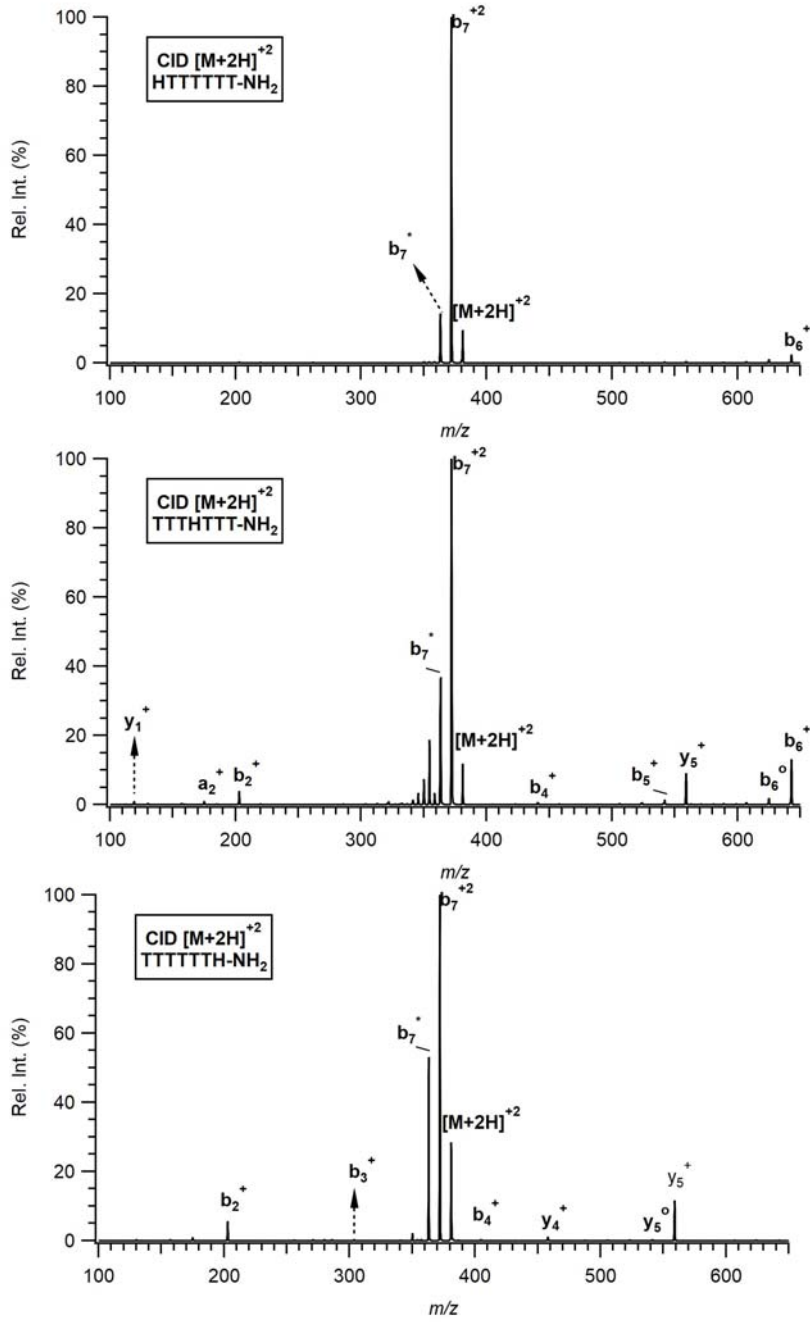


Şekil 50. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden SSSSSS-NH₂ model peptidin CID Kütle Spektrumu



N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin,H, ihtiva eden ve altı tane Serine,S, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 50 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) türü gözlenememiştir. Diğer peptit serilerinden farklı olarak b_7^* ($b_7^{2+}-NH_3$) iyonu gözlenmesi önemli bir farklılıktır. Bunların yanında, tek yüklü iyon türlerinden, b_6^+ iyonu gözlenmiştir. Aynı serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, en şiddetli sinyal olarak aynı şekilde b_7^{2+} iyonu gözlenmiştir; ayrıca, b_7^* ($b_7^{2+}-NH_3$) ve $b_7^*-NH_3$ ($b_7^{2+}-2NH_3$) iyonları en şiddetli diğer iki iyon olarak gözlenmiştir. Ek olarak, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) iyonları da iyon şiddetleri zayıf da olsa gözlenebilmiştir. Ayrıca, y_1^+ , a_2^+ , b_4^+ , b_5^+ , y_6^+ ve b_6^+ iyonlarında mevcuttur. Ayrıca b^0 ($b_6^+-H_2O$) iyonuda gözlenmiştir. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu CID kütle spektrumunda ki en şiddetli iyon olarak gözlenememiştir. Diğer peptit serilerinde görülen bu özellik bu peptit serisinde en önemli farklılık olarak bu görülmektedir. En şiddetli iyon sinyali olarak b_7^{2+} iyonu mevcuttur. Ek olarak b_7^* ($b_7^{2+}-NH_3$) iyonu ikinci en şiddetli iyon sinyali olarak gözlenmiştir. Klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddeti %5 ve y_5^+ iyonunun şiddeti ise yaklaşık olarak %10 civarında gözlenmiştir. Ayrıca, b_7^* ($b_7^{2+}-NH_3$), b_4^+ , y_4^+ , y_5^+ , ve y_5^0 ($y_5^+-H_2O$) iyonlarında gözlenmiştir. İlginç olarak klas 1 türü iyonlar serine peptit sersinin CID spektrumunda en şiddetli iyonlar olarak gözlenememiştir ve bu diğer bütün peptit modellerinden farklı bir gözlemdir.

3.5.9 Çifte Protonlanmış HTTTTTT-NH₂, TTTHTTT-NH₂, ve TTTTTTH-NH₂ Model Peptitlerin Gaz Fazı Parçalanma Reaksiyonlarının İncelenmesi



Şekil 51. Çift Protonlu Histidin ihtiva eden TTTTTT-NH₂ model peptitin CID Kütle Spektrumu



TÜBİTAK

N-ucunda, ortasında ve C-ucunda histidin, H, ihtiva eden ve altı tane Treonin, T, içeren çifte protonlanmış hepta peptitlerden elde edilen CID kütle sinyali Şekil 51 de verilmektedir. MS/MS kütle sinyalleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, histidin N-ucunda bulunduğu en şiddetli sinyal olarak b_7^{2+} iyonu gözleendiği halde, Klas 1 iyon türü olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) türü gözlenememiştir. Diğer peptit serilerinden farklı olarak b_7^* ($b_7^{2+}-NH_3$) iyonu gözlenmesi önemli bir farklılıktır. Bunların yanında, tek yüklü iyon türlerinden, b_6^+ iyonu gözlenmiştir. Aynı serideki peptit modelinde, Histidin amino asidi orta pozisyona geldiğinde, en şiddetli sinyal olarak aynı şekilde b_7^{2+} iyonu gözlenmiştir; ayrıca, b_7^* ($b_7^{2+}-NH_3$) iyonu gözlenmiştir. Ek olarak, klas 1 iyon türleri olarak adlandırılmış olan b_2-y_{N-2} ($b_2^+-y_5^+$) iyonları da iyon şiddetleri zayıf da olsa gözlenebilmiştir. Ayrıca, y_1^+ , a_2^+ , b_4^+ , b_5^+ , y_5^+ ve b_6^+ iyonlarında bulunmaktadır. b^0 ($b_6^+-H_2O$) iyonunda belirgin bir farklılıktır. Histidine C-ucuna geldiğinde, klas 1 iyon türü olan y_5^+ iyonu ve b_2^+ iyonları, CID kütle spektrumunda zayıf olarak gözlenmektedir ve en önemli farklılıktır. En şiddetli iyon sinyali olarak b_7^{2+} iyonu gözlenmiştir. Ek olarak b_7^* ($b_7^{2+}-NH_3$) iyonu ikinci en şiddetli iyon sinyali olarak gözlenmektedir. Klas 1 iyon türü olan b_2^+ iyonunun şiddeti %5 ve y_5^+ iyonunun şiddeti ise yaklaşık olarak %10 civarında gözlenmiştir. Ayrıca, b_7^* ($b_7^{2+}-NH_3$), b_4^+ , y_4^+ , y_5^+ , ve y_5^0 ($y_5^+-H_2O$) iyonlarında gözlenmiştir. İlginç olarak klas 1 türü iyonlar yerine peptit sersinin CID spektrumunda en şiddetli iyonlar olarak gözlenememiştir ve bu diğer bütün peptit modellerinden farklı bir gözlemdir.

CID kütle spektrumlarında gözlenen ve bazik amino asitlerin pozisyonuna bağlı olarak b_2 ve y_5 komplementeri iyonlarının relative iyon şiddetlerinin verildiği tablolar (Tablo 1, Tablo 2, Tablo 3 ve Tablo 4) aşağıda verilmektedir.



TÜBİTAK

Table 1. Çifte Protonlanmış, Histidine ve diğer amino asitlerden oluşan model Hepta peptitlerin (M+2H)²⁺ CID kütle sinyallerinde gözlenen b₂⁺ ve y₅⁺ iyonlarının relative iyon şiddetleri

Peptidler	Relative İyon Şiddetleri(%)		Peptidler	Relative İyon Şiddetleri(%)	
	b ₂ ⁺	y ₅ ⁺		b ₂ ⁺	y ₅ ⁺
GGGHGGG-NH ₂	16	50	GGGGGGH-NH ₂	30	100
CCCHCCC-NH ₂	<5	20	CCCCCCH-NH ₂	50	100
AAAHAAA-NH ₂	26	100	AAAAAAH-NH ₂	30	100
VVVHVVV-NH ₂	<5	<5	VVVVVVH-NH ₂	50	100
LLLHLLL-NH ₂	<5	<5	LLLLLLH-NH ₂	40	100
FFFHFFF-NH ₂	<5	<5	FFFFFFH-NH ₂	50	100
MMMHMMM-NH ₂	<5	<5	MMMMMMH-NH ₂	40	100
YYYHYYY-NH ₂	<5	<5	YYYYYYH-NH ₂	40	100
SSSHSSS-NH ₂	5	10	SSSSSSH-NH ₂	10	20
TTHTTTT-NH ₂	<5	10	TTTTTTH-NH ₂	5	10

Table 2. Çifte Protonlanmış ve Histidine ihtiva eden (M+2H)²⁺ peptitlerin CID kütle sinyallerinde gözlenen b₂⁺ ve y₅⁺ iyonlarının relative iyon şiddetleri

Peptidler	Relative İyon Şiddetleri(%)		Peptidler	Relative İyon Şiddetleri(%)	
	b ₂ ⁺	y ₅ ⁺		b ₂ ⁺	y ₅ ⁺
HAAAAAA-NH ₂	0	0	HYAGFLV-NH ₂	0	0
AHAAAAA-NH ₂	0	0	YHAGFLV-NH ₂	0	0
AAHAAAA-NH ₂	<5	5	YAHGFLV-NH ₂	0	0
AAAHAAA-NH ₂	5	10	YAGHFLV-NH ₂	<5	<5
AAAAHAA-NH ₂	30	100	YAGFHLV-NH ₂	20	50
AAAAAHA-NH ₂	35	100	YAGFLHV-NH ₂	50	100
AAAAAAH-NH ₂	32	100	YAGFLVH-NH ₂	60	100



TÜBİTAK

Table 3. Çifte Protonlanmış ve Lizin ihtiva eden (M+2H) peptitlerin CID kütle sinyallerinde gözlenen b_2^+ ve y_5^+ iyonlarının relative iyon şiddetleri

Peptidler	Relative İyon Şiddetleri(%)		Peptidler	Relative İyon Şiddetleri(%)	
	b_2^+	y_5^+		b_2^+	y_5^+
KAAAAAA-NH ₂	0	0	KYAGFLV-NH ₂	0	0
AKAAAAA-NH ₂	0	0	YKAGFLV-NH ₂	0	0
AAKAAAA-NH ₂	<5	<5	YAKGFLV-NH ₂	0	0
AAAKAAA-NH ₂	34	95	YAGKFLV-NH ₂	10	20
AAAAKAA-NH ₂	34	100	YAGFKLV-NH ₂	20	45
AAAAAKA-NH ₂	33	100	YAGFLKV-NH ₂	50	80
AAAAAAK-NH ₂	40	100	YAGFLV-NH ₂	60	100

Table 4. Çifte Protonlanmış ve Arjinin ihtiva eden (M+2H) peptitlerin CID kütle sinyallerinde gözlenen b_2^+ ve y_5^+ iyonlarının relative iyon şiddetleri

Peptidler	Relative İyon Şiddetleri(%)		Peptidler	Relative İyon Şiddetleri(%)	
	b_2^+	y_5^+		b_2^+	y_5^+
RAAAAAA-NH ₂	0	0	RAGFLV-NH ₂	0	0
ARAAAAA-NH ₂	0	0	YRAGFLV-NH ₂	0	0
AARAAAA-NH ₂	<5	<5	YARGFLV-NH ₂	0	0
AAARAAA-NH ₂	5	20	YAGRFLV-NH ₂	<5	7
AAAARAA-NH ₂	40	100	YAGFRLV-NH ₂	23	41
AAAAARA-NH ₂	40	100	YAGFLRV-NH ₂	62	100
AAAAAAR-NH ₂	40	100	YAGFLVR-NH ₂	76	100



Sekansında bazik amino asit ihtiva eden ve çifte protonlanmış model peptitlerin, gaz fazı parçalanma mekanizmaları ile ilgili detaylı çalışma yapılmıştır. Çalışmada, bazik amino asitlerin pozisyonuna göre ve diğer amino asit sekanslarına göre Sınıf 1 olarak adlandırılan ve b_2 - y_{N-2} ($N=7$) (b_2^+ and y_5^+ komplementeri) iyon oluşum davranışları incelenmiştir.

Bazik amino asidin pozisyonuna göre (N-ucundan sayılarak 4 ile 7 arasında) b_2^+ and y_5^+ komplementeri iyon oluşumu değişik sinyal şiddetinde gözlenmiştir. Sınıf 1 iyon türünün (b_2^+ and y_5^+) CID spektrumundaki sinyal şiddeti, bazik amino asidin C-ucuna yaklaşmasıyla arttığı ve C-ucunda olduğunda da y_5^+ iyonu %100 ve b_2 iyonuda yaklaşık olarak % 40-50 civarında iyon şiddeti göstermektedir. Sadece Serine ve Treonin de bu durum gözlenmemiştir.

Bütün model peptitlerde gözlenen komplementeri b_2^+ and y_5^+ iyon oluşum, (Serine ve Treonin hariç) yük ayırım reaksiyon (charge separation mechanism) mekanizması ile açıklanmaktadır ve Harisson tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada bahsedilmektedir.

Bazik amino asitlerin özelliklerinin ve pozisyonlarının, komplementeri b_2^+/y_5^+ iyon oluşum mekanizmasında çok belirgin bir etkisi olduğu söylenemez. Ancak altı Alanin ve bir bazik amino asit ihtiva eden peptit türevlerinde elde edilen sonuca göre, komplementeri b_2^+/y_5^+ iyonları, bazik amino asit üçüncü pozisyonda bulunduğu gözlenmeye başlanırken, YAGFLV-NH₂ model peptit serisinde, bazik amino asit dördüncü pozisyondayken görülmektedir. Ayrıca, b_7^+ iyonundan tekli amino asit kopmalarının bütün bazik amino asit ihtiva eden YAGFLV-NH₂ seriler için, (değişik iyon şiddetinde olsada) gözlenmesidir. Bu eliminasyon, en belirgin farklılıktır.

Üçüncü model peptitlerde gözlenen en belirgin fark ise yan zincirinde hidroksil (OH) grubu bulduran Tirozine,Y, Serine, S, ve Treonin,T, amino asitlerinden elde edilen CID kütle sinyallerinde Klas 1 iyonları olan b_2 ve y_{N-2} (b_2 ve y_5) iyon şiddetlerinin farklılık göstermesidir. YYYYYYH-NH₂ peptitden elde edilen MS/MS CID kütle spektrumunda bu iki iyonun sinyal şiddeti, diğer model peptit türlerinde olduğu gibi en şiddetli iyon sinyali olarak (y_5 100%, ve b_2 50%) gözlenirken, SSSSSSH-NH₂ ve TTTTTH-NH₂ peptit serilerinin her ikisinde de y_5 ve b_2 iyonlarının sinyal şiddeti yaklaşık olarak %5-10 civarında gözlenmiştir. Bütün peptit serilerinde bazik amino asit C-ucuna geldiğinde y_5 iyonu genelde 100% ve b_2 iyonu yaklaşık 40-50 % olduğu halde sadece bu iki peptit serisinde bu durum farklıdır. Daha önce yapmış olduğumuz değişik çalışmalarımızda ve çıkan yayınlarımızda, Serine,S, ve Treonin,T, ve Tirozine,Y, amino asitlerinde aynı davranış gözlenmiştir. Yapılan yayınlarda bu olay Serine ve Treonin'nin yan zincirinde bulunan OH grubundaki asidik özelliği yüksek



olan Hidrojeden kaynaklandığı; fakat, aynı özelliğin Tirozinde görülmemesinin ise Tirozinin yan zincirinde bulunan ve OH grubunun bağlı olduğu benzen halkasından kaynaklandığı olarak açıklanmıştır. b_2 ve y_5 iyon şiddetlerinde gözlenen bu farklılık, benzen halkasının, bağlı bulunan OH grubundaki hidrojenin asidik özelliğini azaltığından ve bu yüzden de Serin ve Teronin'den farklı bir parçalanma yolağı izlediğinden kaynaklanmaktadır. Daha önce, tekli protonlanmış peptitlerle yapmış olduğumuz değişik amaçlı çalışmalarda gözlemlediğimiz ve bu özelliklerinden kaynaklandığı için değişik parçalanma yolları izleyen bu iki amino asidin, çift protonlanmış ve bazik amino asit ihtiva eden model peptitlerde de aynı özelliği göstermesi ilginç bir gözlemdir ve bu iki amino asidin peptit sekansında bulunduğu bir göstergesi olarak kullanılabilinecek bir informasyondur.

Bu sonuçlar neticesinde, sekansında Serine, Treonin ve bazik amino asit ihtiva eden değişik model peptitler ile çalışma detaylandırılacak ve hepta peptit serisinde gözlenen bu özelliğin, peptit uzunluğu (N= 5,6,8,9,10 vs) ile nasıl değişim göstereceği detaylı olarak çalışılacaktır. Ayrıca, hidroksil grubu dışında, yan zincirinde, değişik fonksiyonel grup bulunduran, (aspartik asit, glutamik asit, asparajin, gibi) amino asitlerle de bu çalışma genişletilecektir. Hisitidin ihtiva eden Serine ve Treonin peptit serisinde görülen bu farklılığın, arjinin, lisin, proline gibi diğer bazik amino asitler varlığında görülüp görülemeyeceği araştırılacaktır.



Kaynaklar Listesi

- [1] Aebersold, R. ve Goodlett, D.R. 2001. "Mass spectrometry in proteomics", *Chemical Reviews*, 101, 269-296.
- [2] Atik, A.E. ve Yalcin, T. 2011. "A systematic study of acidic peptides for *b*-type sequence scrambling", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22, 38-48.
- [3] Atik, A.E., Gorgulu, G., Yalcin, T. 2012. "The role of lysine ϵ -amine group on the macrocyclization of *b* ions", *International Journal of Mass Spectrometry*, 316-318, 84-90.
- [4] Biemann, K. 1988. "Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure", *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 16, 99-111.
- [5] Bythell, B. J., Somogyi, Á., Paizs, B. 2009. "What is the structure of b_2 ions generated from doubly protonated tryptic peptides?" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20, 618-624.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Harrison, A.G. 1997. "The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides", *Mass Spectrometry Reviews*, 16, 201-217.
- [9] Harrison, A. G. 2009. "Charge-separation reactions of doubly-protonated peptides: effect of peptide chain length", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20, 1890-1895.
- [10] Harrison, A. G. 2011. "Effect of proline position on symmetric versus asymmetric fragmentation of doubly-protonated tryptic-type peptides", *International Journal of Mass Spectrometry*, 306, 182-186.
- [11] Karas, M. ve Hillenkamp F. 1988. "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Da", *Analytical Chemistry*, 60, 2299-2301.
- [12] Li, X., Huang, Y., O'Connor, P. B., Lin, C. 2011. "Structural heterogeneity of doubly-charged peptide *b*-ions", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22, 245-254.
- [13] Roepstorff, P. ve Fohlmann, J. 1984. "Proposals for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides", *Biomedical Mass Spectrometry*, 11, 601.
- [14] Savitski, M. M., Fälth, M., Fung, Y. M. E., Adams, C. M., Zubarev, R. A. 2008. "Bifurcating fragmentation behavior of gas-phase tryptic peptide dications in collisional activation", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19, 1755-1763.
- [15] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. 1996. "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels", *Analytical Chemistry*, 68, 850-858.
- [16] 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.
- [17] Tang, X.J., Thibault, P., Boyd, R.K. 1993. "Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation", *Analytical Chemistry*, 65, 2824-2834.
- [18] Tasoglu, C., Gorgulu, G., Yalcin, T. 2012. "Investigation of peptide size, residue position, neighbor amino acid and side chain effect on macrocyclization of b_n ($n=5-7$) ions", *International Journal of Mass Spectrometry*, 316-318, 108-116.
- [19] Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I.G., Peterson, M.R., Harrison, A.G. 1995. "Why are *B* ions stable species in peptide spectra?", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6, 1165-1174.
- [20] Yalcin, T., Csizmadia, I.G., Peterson, M.R., Harrison, A. G. 1996. "The structures and fragmentation of B_n ($n \geq 3$) ions in peptide mass spectra", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 7, 233-242.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. TALAT YALÇIN
Proje No:	215Z257
Proje Başlığı:	Bazık Amino Asit İçeren Çift-Protonlanmış Peptit İyonlarının Gaz-Fazı Parçalanma Mekanizmalarının Kütle Spektrometresi İle Çalışılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2016 - 15/10/2018
Onaylanan Bütçe:	290250.0
Harcanan Bütçe:	187933.09
Öz:	<p>Proteinler, hücre içindeki faaliyetlerin düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptir. Protein içindeki amino asitlerin konumları, birbiriyle olan etkileşimleri, bazık veya asidik amino asitlerin peptit zincirine etkileri proteinlerin hücre içindeki rollerini belirlemekte ve hakkında önemli bilgiler vermektedir. Kütle Spektrometresi (MS) yöntemi, proteinlerdeki amino asit dizilimlerinin bulunmasında oldukça popüler yöntemdir. Proteinler enzimatik bölünmeye uğradığında (Tripsin), kesilmiş peptitlerin C terminalinde, her zaman lizin (K) veya arginin (R) gibi bir bazık amino asit bulunur. Amino asit dizilimlerinde, bazık amino asit ihtiva eden peptit seriler ile, kolaylıkla çoklu protonlanmış peptit iyonları oluşturulabilmektedir. Bu çalışmada, model olarak hepta peptit serileri kullanılmış ve dizilimlerinde bazık amino asitlerden, lizin (K), arginin (R) ve histidin (H), ihtiva eden bu peptitler ile, bu aminoasitlerin pozisyon etkilerini araştırmak için peptit dizisi içinde yerleri değiştirilmiş ve bazık amino asitlerin (C terminaline ve N terminaline yakın) konumunun gaz fazı parçalanma mekanizmasına etkileri detaylı olarak çalışılmıştır.</p> <p>Sonuç olarak; bütün model peptidlerde, bazık amino asitlerin pozisyonları (N-ucundan sayılarak) 4, 5, 6, ve 7'ci pozisyonlarda olduğu zaman Klas 1 parçalanma mekanizmasına bağlı olarak gözlenen b2 ve y5 komplementeri iyonları gözlenebilmektedir. b2 ve y5 iyonlarının göreceli iyon şiddetlerinin, bazık amino asitin C-ucuna yaklaştıkça arttığı gözlenmiştir. Pozisyon veya amino asidin yapısı b2 ve y5 iyonlarının oluşma mekanizmalarına bir etki gösterdiği görülmektedir. Alanin ihtiva eden birinci model peptit örneklerindeki çalışma sonuçlarına göre, b2 ve y5 iyonlarının, bazık amino asitler (N-ucundan sayıldığında) 3. cü pozisyona geldiklerinde gözlenmeye başlanmışken, aynı tür iyonlar, YAGFLV amino asit dizilimleri ihtiva eden diğer model peptit örneklerinde 4.cü pozisyona geldiklerinde gözlenmeye başlamışlardır. Sadece Serin ve Treonin amino asitleri diğerlerinden farklı davranış göstermiştir. Histidin C-ucunda bulunduğu diğer sonuçların aksine, y5 ve b2 iyonu % 5-10 şiddete sinyal seviyesi göstermiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Kütle Spektrometre, gaz fazı reaksiyon mekanizması, CID, peptit, bazık amino asit
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır