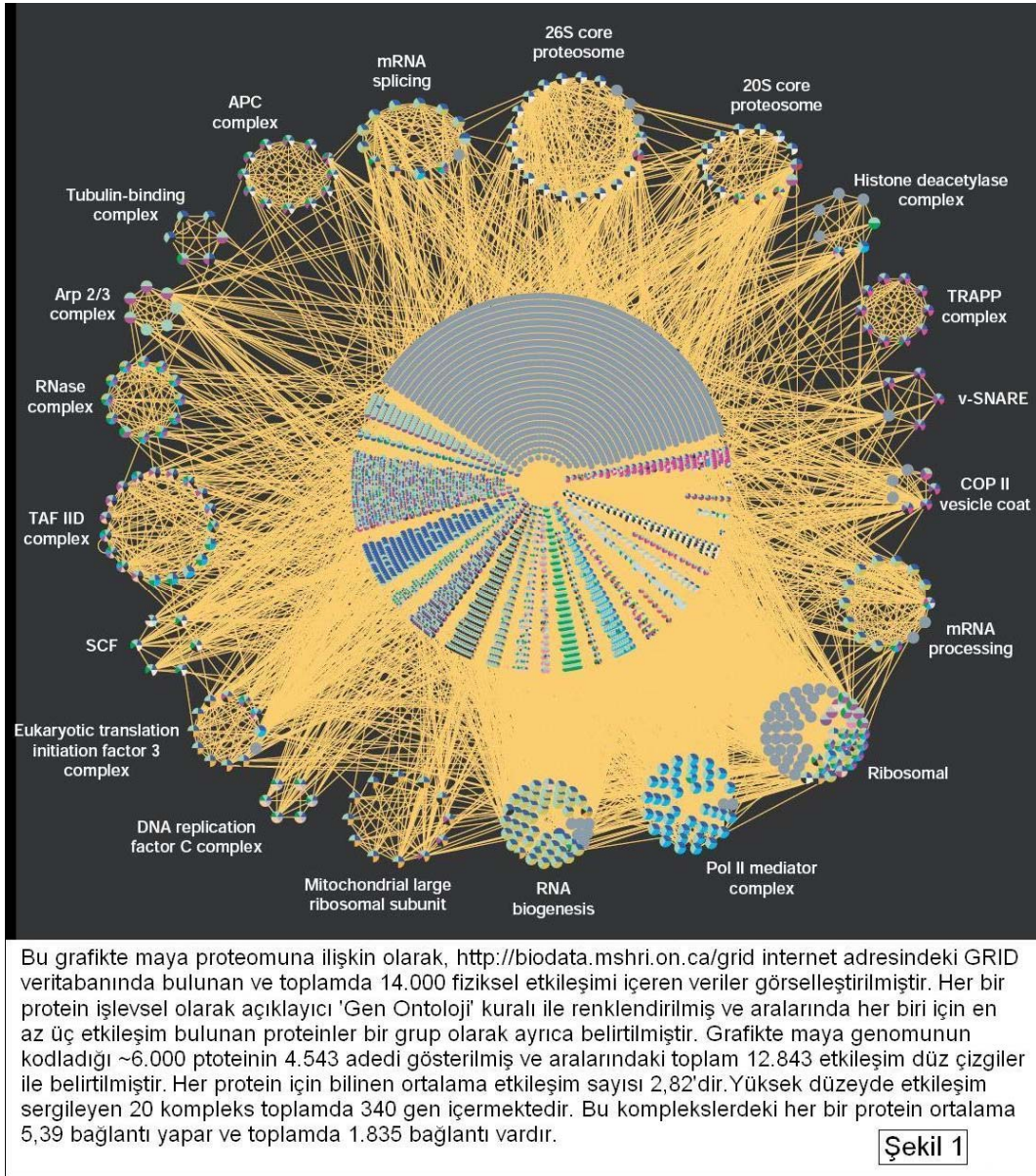


PROTEİN KÜTLE SPEKTROMETRİSİ



Giriş:

“Proteom” terimi ilk olarak ‘uluslararası elektroforez derneği’nin 1994 yılında Siena’da gerçekleştirdiği bir toplantıda Marc Wilkins tarafından önerilmiştir. Wilkins bu terimi bir genom tarafından ifade edilen tüm proteinleri tanımlamak için kullanmıştır. “Proteomik” terimi ise proteomdan türetilmiştir. Proteomik en genel anlamda gen ve hücre fonksiyonlarının doğrudan doğruya protein düzeyinde belirlenmesi ile ilgili olan bilim dalıdır. Bu amaçla, genetik regülasyon ağlarının analizinden, proteinlerin nitelik, nicelik, modifikasyon durumu, ifade düzeyleri ve birbirleri ile geliştirdikleri etkileşimlerin analizine kadar geniş bir çalışma alanı proteomik olarak tanımlanır. Aslına bakılırsa

proteomiğin bu derece önem kazanması ve mevcut halini almasındaki başlıca etken, genom projesinin sonuçlarının yarattığı şok etkisidir. 100.000 ila 120.000 arası olduğu düşünülen insan gen sayısının sadece 30.000 civarında olduğunun anlaşılması, canlılık ile ilgili bilginin DNA’nın baz dizilerinde değil de sistemin genel işleyişinde aranması gerektiği gerçeğini ortaya koymuştur (yakın zamandaki bazı çalışmalarda bu rakam 25.000 ila 29.000 arasında verilmektedir. Gen kavramı ve bir genin nerede başlayıp nerede bittiği ile ilgili tartışmalar da buna eklendiğinde neredeyse toplam gen sayımızın, kromozom sayımızdan az(!) çıkabileceğini düşünmeye başlıyoruz. 25.000 rakamı için

bkz: Pennisi, E. Human genome. A low number wins the GeneSweep Pool. *Science* **300**, 1484 (2003)). Proteomik çalışmalarıyla ilgili bazı internet adresleri aşağıda verilmiştir.

Proteomik Web Siteleri

- 1.) <http://base-peak.wiley.com>
- 2.) <http://www.narrador.embl-heidelberg.de>
- 3.) <http://prospector.ucsf.edu>
- 4.) <http://www.narrador.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/PeptideSearchIntro.html>
- 5.) <http://www.matrixscience.com>
- 6.) <http://www.seqnet.dl.ac.uk/bioinformatics/webapp/mowse>
- 7.) <http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>
- 8.) <http://www.lsbcc.com:70/lutefisk97.html>
- 9.) <http://www.m-scan.com>
- 10.) <http://www.protana.com>
- 11.) <http://www.expasy.ch/tools>
- 12.) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 13.) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbest/index.html>
- 14.) <http://genome-www.stanford.edu/saccharomyces/>

Aslına bakılırsa insan genom projesi bu şok edici sonuçları vermeden önce düşünülen şey, proje sonunda tüm genlerin ürettiği proteinlerin yalnızca işlevlerinin belirlenmesinin (amino asit dizileri, nükleotid dizilerinden zaten elde edilebileceğine göre) bütün bilinmeyenleri aydınlatacağı yönünde idi. Fakat bugün ortada olan gerçek, proteinlerin oluşturduğu karmaşık ağın taşıdığı bilginin, genomik bilgiden daha fazla olup, ondan türetilmeyeceğidir. Sonuçta DNA düzeyinde bile doğrusal olmaktan uzaklaşıp, işlevsel ve sistemik bir bakış açısına doğru yönelen yaklaşımlar, protein düzeyinde hemen tamamen etkileşimlerin yarattığı genel sistem ve ağın dinamiklerinin belirlenmesi eksenine kaymıştır. İşte burada kilit olan bilgiler, proteinlerin primer dizilerinden, üç boyutlu etkileşimlerinin yarattığı ağın devrim parametrelerinin tespitine kadar uzanır. Bu tür bilgiler doğaları gereği edinilmesi zor bilgilerdir. Zira yaşamsal sistemi parçalarına bölüp analiz etmek, kazanılması hedeflenen bilginin yok olmasına, sistemin korunmaya çalışılması ise aksine bilgi edinme becerisinin ciddi biçimde azalmasına yol açacaktır. Sonuçta bu sıkıntıları aşmak için mevcut olanlardan daha sofistike analiz tekniklerine gereksinim duyulacağı açıktır. İşte "protein kütle spektrometrisi" bu konuda atılmış en ciddi adımlardan biridir.

Bir proteini tanımlamakta kullanılan en temel parametre kütleleridir. Bir proteinin kütlelerinin bilinme hassasiyeti arttıkça, onun muhtelif etkileşimlerde aldığı rolü bilme imkânı da artar. Kütledeki değişmelere bağlı olarak, bağlı kofaktör veya metal iyonlarının varlığından, kovalent modifikasyonlara kadar pek çok konuda bilgi edinilebilir. İşte bu nedenle protein kütle spektrometrisi (mass spectrometry – MS), proteomik çalışmalarının temel analitik yöntemidir. Bu teknik ile proteinlerin kütlelerinin belirlenmesi çok büyük bir hassasiyetle yapılabilmekte ve dizi analizleri, kısa zamanda, yüksek bir doğrulukla ve proteinlerin yapısından

kaynaklanan pek çok sınırlamadan (çözünürlük, post-translasyonel modifikasyonlar, serbest N-terminalinin olup olmaması v.b.) etkilensiz yapılabilmektedir. İster *de novo* dizileme adıyla anılan ve doğrudan doğruya kütle spektrometresinden alınan veri üzerinden dizi tespiti yapan teknik için olsun, isterse de daha sonra geliştirilmiş olan, geniş çaplı proteom taramaları için kullanılan ve spektrometreden elde edilen spektrumu geniş veri tabanlarıyla karşılaştırarak dizi ve işlev bilgisine ulaşmaya çalışan sistemler için olsun, geliştirilen dizileri betimlemekte biyoinformatik yöntemleri ve ilişkili tek harfli amino asit kodları kullanılır (Tablo.1).

Kütle spektrometrisi sadece kütle ve dizi analizi yapmaya yarayan bir yöntem olmaktan öte, aynı zamanda çok değerli protein etkileşimleri bilgisine ulaşmamıza imkân verecek bir tekniktir. Protein etkileşimleri zamanımızın ve yakın geleceğin muhtemel en güçlü süper bilgisayarları için bile devre yaktıracak zorlukta birer sorun kaynağıdır. Küçük sayılabilecek boyutlardaki proteinler için bile 10^{30} 'lar düzeyinde olan muhtemel konformasyonların tüm proteinler için bilgisayarlarca hesaplanmasını hayal etmek bile zorken, bunlar arasındaki tüm etkileşimleri yine bilgisayarlarla ve salt primer dizilere bakarak bulmayı hedeflemek akılcı bir yaklaşım değildir. İşte bu konuda da MS analizi ciddi olanaklar sunmaktadır (Şekil.1/a ve 1/b).

Protein Dizileme Çalışmaları:

Protein dizileme çalışmaları yeni bir araştırma alanı değildir. İlk olarak F. Sanger kendi geliştirdiği kimyasal ile bir proteindeki serbest N-terminallerinin sayısını bulmanın ve dolayısıyla proteinlerin dördüncül yapıları hakkında bilgi sahibi olabilmenin yolunu açmıştır. FNDB (1-floro-2,4-dinitrobenzen) isimli kimyasalın kullanımı ile protein yapısındaki N-terminal a.a.'leri belirlemek şekilde görüldüğü gibi mümkündür (Şekil.2). Daha sonra aynı amaç için başka kimyasallar da geliştirilmiştir. Bunların iki örneği Dansyl ve Dabsyl klorürler şekil.3'te belirtildiği gibidirler.

Ancak bu konudaki asıl gelişme Edman degradasyonu ile proteinlerin dizilerinin tamamının elde edilmesi ile sağlanmıştır (Şekil.4). Bu yöntemde polipeptit zinciri her döngüde yalnızca bir a.a. kısaltmakta ve fakat degrade olmadan yeniden kazanılabilmektedir. Böylece bir a.a. kısaltmış olan peptidin N-terminalindeki ikinci a.a. de ikinci bir reaksiyon ile koparılıp analiz edilebilmektedir. Böylece sırasıyla tüm a.a. dizisini elde etmek teorik olarak mümkündür. Fakat bu yöntemin de kendine has kısıtlamaları vardır ve pek çok durumda istenilen sonucun alınması mümkün olmamaktadır. Özellikle yöntemin ilk a.a.'i koparmada %100 etkin olmadığı durumda ki, etkinlik hemen hemen hiçbir

zaman %100 değildir, bir sonraki basamağa geçen ancak bir önceki basamağa ait olan a.a.'lerin yarattığı zemin gürültüsü özellikle 50. basamaktan itibaren son kopan a.a.'in tespitini neredeyse imkânsızlaştırmaktadır. Yine eğer varsa post-translasyonel modifikasyonlar hem sistemi durdurabilmekte hem de tespit edilememektedir. Hepsinin ötesinde eğer proteinin serbest N-terminali yoksa veya ilgili reaksiyon için çözünür hale getirilemiyorsa, yöntem en başından çöker ve hiçbir uygulama yapılamaz. Tüm bu zorlukların üstesinden gelebilmek için (Şekil.5) önce proteinin a.a. kompozisyonu belirlenir ve böylece dizi özgül proteazlarla muamele edildiğinde vereceği parçaların sayısı anlaşılır. Ayrıca Sanger reaktifi ile N-terminal a.a.'i belirlenir. Daha sonra iki farklı ve dizi özgül kesim reaksiyonu ile polipeptit 35–40'dan az sayıda a.a. içeren parçalara bölünür ve saflaştırılan her bir parçanın Edman degradasyonu ile dizisi belirlenir. Belirlenen diziler daha önce elde edilen bilgiler ışığında karşılaştırılarak ana diziye ulaşılır. Bu uygulamalardan önce varsa di-sülfid bağlarının koparılması gerekir (Şekil.6). Bunun için ya performik asit ile sistein a.a.'leri okside edilip sisteik aside dönüştürülür ya da ditiyotreitöl (DTT) veya uygun başka bileşikler (β -merkaptöetanol, glutatyon v.b.) ile sistein köprüleri indirgenip açıkta kalan -SH grupları iyodoasetat ile asetillenerek inaktive edilir.

MS'de Genel Kavramlar:

Klasik yöntemlerin yukarıda da belirtilen eksikliklerine kıyasla kütle spektrometrisi son derece hassas ve kolay uygulanır bir yöntemdir. Pek çok durumda proteinlerin sadece dizisini değil, aynı zamanda post-translasyonel modifikasyonlarını, işlevlerini ve birbirleri ile olan ilişkilerini de ortaya çıkartabilecek uygulamaları olan, böylece proteomik çalışmaları için temel bir yöntem oluşturan kütle spektrometrisi aslında yeni bir teknik değildir. 1960'lardan beri pek çok basit yapıli bileşiğin yapısal analizi için kullanılan bu teknik, uzunca bir zaman karmaşık organik moleküller için kullanılabılır olmamıştır. Zira uygulamada ilgili bileşiğin buharlaştırılması ve iyonize edilip vakum ortamında ivmelendirilmesi gerekmektedir. Proteinlerin yapıları gereği çok kuvvetli moleküller arası etkileşimleri mevcuttur. Bu sebeple pek çok organik bileşik gibi ve çok daha belirgin olarak proteinlerin teorik ve pratikteki buhar basınçları sıfırdır. Bu tür bileşikler buharlaştırma yolunda yapılan girişimler genelde ciddi yapısal degradasyon ile sonuçlanmaktadır. Aynı şekilde iyonizasyon süreçleri de muhtelif zorluklar taşımaktadır. Sonuçta her hangi bir teorik engel olmamasına karşın pratikte uygulama, uzunca bir süre mümkün olamamıştır. Bu gidişati değiştiren şey ise proteinleri tahrip etmeden buharlaştırıp, iyonize etmeyi başaran biri Nobel ödüllü iki tekniğin geliştirilmiş olmasıdır. Bu aşamada buhar-

laşmış ve iyonize olmuş protein ve/veya peptit molekülleri spektrometrik analize hazır durumdadır.

Bir kütle spektrometresinin algılayıcısı tipik bir fotomultiplikatör gibi çalışır. Detektörün çalışma biçimi, iyonun hedefe çarpmasının yarattığı güçle oluşturulan ve hedeflendirildiği zıt yüklü plakalar ile gücü artırılan bir elektron sağanağının oluşturulması üzerine kuruludur. Sonuçta en küçük yük için bile hissedilir bir sinyal oluşturulur. Bu tür cihazlarda tipik yükseltgenme oranı her iyon başına 10^6 elektron gibi son derece yüksek değerlerdedir (Şekil.18). Ancak kolayca görülebileceği gibi cihaz, moleküllerin kütlelerini değil yük kütle oranlarını ölçebilir. Zira temel olarak bilinenler, moleküllerin kaynaktan çıktıktan sonra hedefe varıncaya kadar geçirdikleri süre ve buna bağlı olarak da hızları ile detektöre ulaşan belirli bir türün orada bıraktığı elektriksel yüküdür. Hedefte bırakılan yük hem moleküllerin taşıdığı yük ile hem de miktarları ile doğru orantılıdır. Aynı şekilde kaynaktan aynı anda çıkan moleküllerden hangisinin hedefe daha önce çarpacağını da hızı belirler. Böyle bir ortamda (vakumda) moleküllere etki eden kuvvet $\vec{F}=m \cdot \vec{a}$ yasası gereği ivmeli bir harekete neden olur. Bu denklemdeki $\vec{F}$ (kuvvet) her tür molekül için sabit olsaydı, kütleleri ile ters orantılı bir ivmelenmelerinin olmasını ve böylece kütlelerinin de kolayca hesaplanmasını beklerdik. Oysaki sabit bir elektrik alanında ($\vec{E}$) elektrikle yüklü parçacıklara etkiyen kuvvet, $\vec{F}=q \cdot \vec{E}$ denklemi ile verilir (q =yük). Yani bu kuvvet hem elektrik alanın yenginliği ile hem de parçacığın taşıdığı yük ile orantılıdır. Toparlarsak spektrometrede oluşan ivmeyi $\vec{E} \cdot q = m \cdot \vec{a}$ denklemi gereğince (ve elektrik alanın her iyon için sabit olduğu gerçeği göz önünde tutulduğunda) yük/kütle oranı belirler (aynı şekilde kütle/yük oranı şeklinde de alınabilir). Böylece kaynaktan aynı anda çıkan ve aynı yük/kütle oranına sahip olan tüm türlerin detektöre aynı zamanda ulaşmaları beklenir. Görüldüğü gibi sonuçlar her zaman için birden fazla bilinmeyenin olduğu denklemler şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu denklemlerden sonuç üretmenin iki yolu vardır; matematiksel analiz yöntemleri kullanılarak sonuç üretilebilir veya sistem çok iyi kalibre edilerek hedefe yönlendirilen her tür için ön bilgi elde edilir ve taşıyabilecekleri yük kısıtlanır. Pratikte her iki yöntem de bir arada ve otomatize edilmiş olarak kullanılır. Spektrumu verilen örnekte (Şekil.7) sistem sadece tek bir proteinin kütle analizi için kullanılmıştır. Sonuçta, ilgilenilen proteine ilişkin spektrumdan kütlelerini çok hassas bir şekilde elde etmek mümkündür. Bu örnekteki proteinin iyonizasyon sürecinde pek çok farklı yük/kütle oranına sahip türevi oluşmuştur. Açık ki bunun nedeni farklı düzeyde yüklenen moleküllerdir. Örneğin birbirine komşu iki piki ele alalım. Bunların arasındaki yük cinsinden fark 1'dir. Bu fazladan yükün taşıyıcısı olan protonun kütlelerinin de proteinin toplam kütlelerine eklenmesi nedeniyle

aralarındaki kütle farkı da birdir. Böylece bir birine komşu iki piki $(m/z)_1$ ve $(m/z)_2$ değerleri için;

$$(m/z)_{.1} = \frac{M + (xp)}{xq} \Rightarrow \frac{M + x}{x}$$

$$(m/z)_{.2} = \frac{M + (x+1)p}{(x+1)q} \Rightarrow \frac{M + (x+1)}{x+1}$$

eşitlikleri yazılabilir (M =proteinin kütlesi; p =protonun kütlesi olan +1; q =protonun yükü olan +1; x =ilgili proteinin $(m/z)_1$ piki için net yükü). Burada görüldüğü gibi denklemlerde iki adet bilinmeyen vardır (M ve x). “ x ” değerini doğrudan doğruya MS grafiğini inceleyerek bulmak mümkündür (Bkz: Standart Proteomik Deneyi; 7.Verilerin İncelenmesi, ilk paragraf). Buna rağmen bu iki denklemin “ x ” ve “ M ” için çözümlerini kullanmak da mümkündür. Bu tip hesapların pek çok pik için tekraren yapıp ortalamalarının alınması sonuçların kesinliğini artırır. Ayrıca çeşitli bilgisayar algoritmaları, pek çok m/z değerinden oluşan bir spektrumu tek bir pike dönüştürüp son derece hassas bir kütle ölçümü yapmakta kullanılabilir. Şekil.7’deki örnekte aerolysin’in kütlesi %0,01’lik bir hata oranıyla, 47.342 Da olarak hesaplanmıştır.

Günümüzde kullanılan teknik sıklıkla “*Tandem MS*” (ardı ardına kütle spektrometrisi), “*MS/MS*” veya “*MS²*” olarak adlandırılır. Bunun nedeni aslında cihaz içinde arka arkaya iki spektrumun oluşturulması olgusudur. İlk protein veya genelde polipeptitleri ayrıştıran ikincisi ise dizi analizinin yapıldığı iki farklı spektrumdur. Grafikte görüldüğü gibi kurulan sistem sayesinde (Şekil.8) tam ve ayrıntılı bir analiz gerçekleştirilir. Sistem yeterince iyi kalibre edilmişse çarpışma hücreesindeki her bir peptit türü için ortalama bir kırılma olayı yaşanır. İlk bölmedeki ayrışma nedeniyle belirli bir zaman diliminde çarpışma odasında etkilenen yalnızca bir tür peptit vardır. Yine sağlanan kalibrasyon sayesinde bu peptitler genel olarak +1 yüklüdür. Peptitde oluşan kırılmalar, ortamın vakum koşulları nedeniyle iyon değil serbest radikal oluşumu ile sonuçlanır. Böylece taşınan +1 yük oluşan iki parçadan yalnızca birinin üzerinde kalır. Detektörce belirlenebilecek olan da işte bu parçadır. Dikkat edilirse tıpkı Sanger dizi analizinde olduğu gibi atasal peptidin birer a.a. farkla bir birinden ayrılan pek çok farklı boyda parçasının oluşabileceği ve oluştuğu görülür. İşte bu parçalar çarpışma hücre-sinden detektöre varıncaya kadar farklı kütleleri nedeniyle farklı miktarda ivmelenir ve detektöre farklı zamanlarda ulaşır. Elde edilen veri grafiği (Şekil.9) üzerindeki yük/kütle oranları arasındaki farklılıklar, daha sonra çarpan parça ile önceki arasındaki tek bir a.a.’in kütle farkından kaynak-

landığı için ilgili a.a.’in tespit edilmesi mümkün olur.

Standart Proteomik Deneyi:

Bugün standart bir proteomik deneyi olarak kabul edilen olağan bir kütle spektrometrisi deneyi sırasıyla şu basamaklardan oluşur (Şekil.10). 1.Protein örneklerinin ilgili kaynaktan izolasyonu. 2.Protein örneğinin bir ön eleme oluşturmak maksadıyla SDS-PAGE veya 2D-PAGE ile ayrıştırılması. 3.Jelden kazanılan proteinlerin dizi özgül proteazlarla peptitlere parçalanması. 4.Peptitlerin HPLC veya İon-exchange kromatografisi gibi yöntemlerle ayrıştırılıp mümkün mertebe saflaştırılması. 5.Oluşan her bir örneğin buharlaştırılıp iyonize edilmesi. 6.İyonize buhar üzerinde spektrometrik analiz yapılması. 7.Verilerin incelenmesi.

1.İzolasyon: Proteinlerin kaynaktan izolasyonu pek çok standart prosedür ile gerçekleştirilebilir. Bu işlemde kullanılacak prosedür hedeflenen analize göre belirlenir. Eğer kaynağın proteom analizi yapılacaksa tam protein izolasyonu yapılır. Ancak özel bir protein veya protein grubu çalışılacaksa bunların izolasyonuna yönelik prosedürler uygulanır.

2.PAGE: Bu ikinci basamak bir **ön eleme basamağıdır**. Çünkü poliakrilamit jel elektroforezi ile ayrıştırılan proteinlerin aynı kütlede olanları aynı bantta toplanır (denatüre koşullarda!). 2D (iki boyutlu) PAGE uygulamasında (bir boyutta SDS ile denatüre koşullarda, 90° farklı diğer bir boyutta ise bir pH gradiyenti ile izoelektrik noktalarına göre yapılan ayrıştırmada) bile jel üzerindeki tek bir lekenin sadece bir proteine ait olduğu kesin değildir. Yine post-translasyonel modifikasyonlar pek çok sorunlara neden olur. Bu nedenle genelde uygulanan yöntem PAGE sonrası oluşan bantları kesip her bir banttan kazanılan proteinlerin kütle spektrometrik analizinin ayrı ayrı yapılmasıdır (Şekil.11). Son olarak akıldan çıkarılmaması gerekir ki, pek çok klasik yöntemle belirlenemeyecek kadar düşük miktardaki proteinler bile kütle spektrometresince saptanabilirler. Bu nedenle özellikle aranılanın bilinmediği durumlarda ön eleme basamakları işlemin karmaşıklığını azaltma ve bir ön-bilgi edinme aşaması olarak görülmeli, izolatin tamamı için kütle spektrometresi analizi yapılmalıdır.

3.Dizi Özgül Proteazlarla Muamele: Kütle spektrometrisi, en yüksek etkinlikle 500 – 3000 Dalton aralığındaki polipeptitler için sonuç üretir. Bunun nedeni daha büyük molekül ağırlıklı ve dolayısıyla daha uzun zincirli polipeptitlerin hem yüksek bir etkinlikle iyonize buhar haline getirilemesi ve son derece karışık bir spektrum üretmesi-

dir. Tek bir proteinin çalışılacağı ve iyi ayarlanmış koşullarda bu basamak atlanabilir. Ancak geniş ölçekli proteom analizlerinde temel basamaklardan biridir. Veri tabanlarının bir biri ile tutarlılığını sağlamak ve böylece karşılaştırma kolaylığı yaratmak amacıyla genellikle tripsin kullanılır. Tripsin kullanımının bir diğer nedeni de karboksi terminalinde bazik amino asitler bırakarak aşağıda açıklandığı gibi analizi daha kolay 'y' türü iyonlar oluşturmaktır. Tripsin iki farklı bölgeye özgüdür (Arg-C ve Lys-C). Yani polipeptit zincirinde her arjinin ve lizin amino asidinin C-terminalindeki a.a. ile arasındaki bağı hidroliz eder. Ayrıca fiziksel dayanımı olup kolay bir kullanım sağlar. Yaygın kullanılan bir diğer dizi özgül proteaz ise Endopeptidaz Lys-C'dir. Bu enzim 8M üre gibi gerçekten zorlayıcı koşullar altında bile etkindir. Özellikle çözünür hale getirilmesi zor olan veya diğer proteinlerle güçlü etkileşimleri olan proteinlerle çalışılırken kaçınılmaz olan denatüre edici koşullarda kullanımı, olumlu sonuçlar verir. Seçilen enzimin dizi özgüllüğün sebebi ise mümkün mertebe bir biri üzerine çakışmayan ve kısmen de olsa öngörülebilir parçaların oluşmasının sağlanmasıdır.

4. Peptitlerin Ayırıştırılması: Oluşturulan polipeptitler HPLC veya Ion-exchange kromatografisi gibi yöntemlerle saflaştırılarak ayrı ayrı (MALDI tekniğinde) veya doğrudan doğruya kolon çıkışının analize yönlendirilmesi ile (ESI tekniğinde) incelemeye alınabilir. Bu basamağın temel amacı spektrumun zaman ölçeğinde genişliğini artırmak ve incelenmesini kolaylaştırmaktır. Her ne kadar molekülleri önce yük/kütle oranına göre ayırıştıran ve çarpışma hücrelerine sırayla aktaran cihazlar ve teknoloji mevcutsa da bu ön ayırıştırmının en azından iki önemli faydası olacaktır. Birincisi bahsedildiği gibi spektrum aralıklarını milisaniyelerden dakikalara çıkacak olması, ikincisi ise aynı yük/kütle oranına sahip olabilecek muhtemel moleküllerin daha önceden hidrofobisite veya izoelektrik nokta pH'sı gibi özelliklerine göre ayırıştırılarak iç içe geçmiş spektrumların oluşumunun engellenecek olmasıdır. Aslında son derece karmaşık polipeptit karışımları için HPLC kolonlarının kullanımı yeni bir uygulamadır. Çünkü daha önceki HPLC kolonlarının ayırıştırma gücü düşük ve akış hızları yüksekti. Sonuçta karmaşık polipeptit karışımlarının ayırıştırılması etkin olarak gerçekleştirilemediği için kolon çıkışının doğrudan kütle spektrometresine bağlanması söz konusu olamıyordu. Günümüzde kullanılan Yüksek-Performans Sıvı Kromatografisi kolonlarının iç çapı 50 – 150 µm ölçeğinde olup uzun hidrofobik alkil grupları içermesi nedeniyle hidrofobisiteye göre ayırıştırma yapar. Bu tip kolonlarda akış hızı da son derece düşük olup 100nl/dak (0,1µl/dak veya 0,0001ml/dak) civarındadır ve bu miktar doğrudan kütle spektrometresine yönlendirilmeye uygundur. Bu tip kolonlar çoğu zaman birkaç µg dolayında

örnekle yüklenirler ve bu örneğe ilişkin olarak alınan yaklaşık 1 saat'lik spektrumda her bir polipeptit yaklaşık 10 ila 60 saniye genişliğinde bir pik verir. Bu tip polipeptit piklerinin analizi ile her bir polipeptit hakkında gerekli bilgi elde edilir.

5. Buharlaştırma ve İyonizasyon: Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı en sorunlu aşama buharlaştırma ve iyonizasyon basamağıdır. Bu iş için geliştirilmiş iki farklı teknik vardır. Bunlar; ESI ve MALDI'dir.

a.) MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization): Bu teknikte analit (polipeptit karışımı) kendisine kıyasla aşırı miktarda olan ve morötesi soğurucu karakterde olan bir matriks içine gömülü olacak şekilde hazırlanır. Matriks malzemesi genelde düşük molekül ağırlıklı aromatik yapılı organik asitlerden seçilir (gliserol, tiyogliserol veya nitrobenzil alkol gibi bileşikler de kullanılır). Bu yapıya uygun dalga boyunda lazer ışını gönderilmesi ile matriks molekülleri süblimleşir ve bunlara görece olarak çok düşük miktarda olmaları nedeniyle birbirleri ile temas halinde olmayan polipeptit molekülleri kendilerini gaz fazında bulurlar. Bu ortamda meydana gelen çok sayıda çarpışma sonucunda çeşitli miktarlarda artı ve eksi yüklenmiş polipeptit molekülleri oluşur. Artı yüklü moleküller bir elektrik alan yardımıyla buharlaşma yüzeyinden uzaklaştırılıp spektrometreye yönlendirilirler (Şekil.12). Bu yönlendirme elektrikle yüklü bir ekstraksiyon ızgarası ile yapılır. Aslında böylece birbirlerinden gelişi güzel uzaklıklarda bulunan iyonların mümkün mertebe aynı düzlemde toplanması da sağlanmaya çalışılır (Şekil.13). Bu sayede sırf daha geriden geldiği için daha büyük kütleli bir moleküle aynı anda detektöre varan küçük kütleli moleküllerin varlığı gibi sorunlar engellenir. Ayrıca kullanılan organik asitler ve lazerin dalga boyu, matriks moleküllerinin iyonlaşmaları ve böylece polipeptitleri de iyonlaştırmaları için özel olarak seçilir. Aslında MALDI, temel kavramı itibarıyla Protein Kütle Spektrometrisi çalışmalarını başlatan yöntemdir. Eskiden "Hızlı Atom Bombardmanı" ("FAB-MS / Fast Atom Bombardment – MS") gibi tekniklerle bu temel mantık uygulama alanı bulmuştur (bu amaçla genel olarak yüksek hızlı Sezyum iyonları [Cs⁺] kullanılmış). Ayrıca teknik sadece proteinler için değil pek çok başka biyolojik ve organik molekül için de kullanılmış ve hala da kullanılmaktadır (Tablo.2'de çeşitli matriks malzemeleri ve kullanım amaçları verilmiştir). Eskiden MS uygulaması için proteinlerin polariteleri de kimyasal olarak düşürülürdü. Bu amaçla özellikle arjinin amino asitlerinin guanido grupları hidrazinolit ile uzaklaştırılır ve bütün amino grupları asetik anhidrit ile asetile edilirdi. Ardından bütün karboksil, hidroksil ve NH grupları kuvvetli bir baz ile permetile edilip, ardından metil iyodat ile muamele edilip metillenmiş halde bırakılırlardı. MALDI ve özellikle

ESI'nin gelişmesi bu uygulamaları gereksizleştirmiştir.

b.) ESI (Electrospray Ionization, 2002 Nobel Kimya ödülü): İlk olarak 1988/1989 yıllarında Münster Üniv. Deneysel fizik grubundan Prof. Dr. M. W. Benninghoven tarafından uygulanmıştır. Bu teknik doğrudan HPLC kolonunun çıkışında uygulanır (Şekil.14). Kolonun ucuna çapı, kolon çapından çok daha küçük (~8µm) bir iğne yerleştirilir (Şekil.15). Bu iğnenin çıkışı çok daha dar olup nm ölçeğindedir (Şekil.16) ancak uygulamanın ardından basınç ve sürtünme etkileri nedeniyle 1–2 µm'ye kadar genişler. İğne ile çıkış yönündeki levha arasına yüksek bir potansiyel fark uygulanır (~birkaç kV kadar). Oluşan püskürme sonucu son derece küçük damlacıklar oluşur. Akış hızının 20nl/dak veya daha az olduğu koşullarda damlacık çapı ~200nm veya daha azdır. Eğer analit konsantrasyonu 1pmol/µl düzeyinde tutulmuşsa o zaman her damlacık başına yaklaşık 1 polipeptit molekülü düşer. Damlacığın uçuşu sırasında taşıyıcı faz hızla buharlaşır (oda koşullarında) ve yüksek potansiyel fark nedeniyle damlacığın üzerinde oluşan yük, polipeptide aktarılır. Polipeptit molekülleri iyonlaşan su ve amonyak gibi taşıyıcı faz moleküllerinden aldıkları protonlar nedeniyle pozitif yüklenirler. Taşıyıcı faz, pozitif yüklü iyonların oluşumunun kolaylaştırılması için çoğu zaman asidik pH'da tutulur. Birden fazla analit içeren damlacıklar aynı yüklü analit moleküllerinin birbirlerini itmesi nedeniyle parçacık yarılmaya denilen bir süreçle ayrışır. Sonuçta buhar fazında ve iyonize olmuş polipeptit ve/veya protein molekülleri oluşturulmuş olur. Dikkat edilirse istenilen sonucun elde edilebilmesi tamamen kalibrasyona bağlıdır. Molekülün başka moleküllerle etkileşime girmemesi ve istenilen düzeyde elektrik yüklenmesi hep koşulların ayarlanması ile sağlanır. İdeal düzeyde iyonlaşmış buhar, iğne çıkışı istikametinde bulunan ve negatif yüklü olan bir levhanın ortasındaki küçük açıklıktan vakum ortamına girer (Şekil.17). Artık MS analizi başlamış olur.

6.MS Analizi: Pek çok farklı çeşit kütle spektrometresi vardır. Ancak iyonize analit hedefe çarptığında bir tespit sinyalinin oluşturulması temelde hep aynı yöntemle sağlanır. Daha önce de belirtildiği gibi hedefte meydana gelen elektrik deşarj bir elektron sağanağının üretilmesi ile hissedilir güçte bir sinyale dönüştürülür (Şekil.18). Farklı zamanlarda alınan farklı güçlerdeki sinyallere göre m/z oranının tespitinde kullanılan yöntemler cihazdan cihaza farklılık gösterir. TOF (Time of Flight) (Şekil.19) türü cihazlarda bu ölçüm, cihazın içindeki yol boyunca kaydedilen zamanın türevidir. Doğaldır ki farklı kütle ve aynı yüke sahip moleküller, sabit bir elektrik alanında, aynı anda ivmelendirilirse; üzerlerine etkiyen kuvvet aynı olacağından, belirli bir zaman sonundaki hızları kütleleri ile ters orantılı

olur (bkz: yukarıdaki denklemler). Bu nedenle MALDI gibi moleküllerin çıkış zamanının aynı olduğu bir sisteme eklenen TOF türü bir kütle spektrometresi aynı yükü taşıyan moleküller için, zamana karşı, en düşük kütlelienden en yüksek kütleliye doğru olmak kaydı ile bir spektrum verir. Bu spektrumda her bir pikin şiddeti ilgili türün göreceli miktarı ile doğru orantılıdır. Kolayca görülebileceği gibi bu spektrumun aynısı, örneğin bir fazla yüklü türler için de meydana gelecek fakat bu spektrum diğerinden daha önce alınacaktır, zira bu grubun içindeki moleküllerin bir öncekilere oranla kazanacağı ivme daha fazla olacaktır. Aynı şekilde piklerin zaman aralıkları da, göreceli oranları değişmeksizin azalacaktır. Böyle bir spektrumda her bir türün aynı spektrumdaki diğer türler ile göreceli mesafesi (tabii eğer her iki spektrumda da temsil ediliyorsa) aynı kalacaktır. Buna karşın diğer tüm nicel değerler farklı olabilir. Örneğin her bir türün, spektrumlar arası kıyaslamada şiddetinin aynı kalması olasılığı hem düşüktür (zira farklı miktarda yüklenmiş türlerin tam olarak aynı miktarda oluşması olasılığı düşüktür) hem de muhtelif kalibrasyonlarla engellenmeye çalışılan bir durumdur. Ayrıca örneğin +2 yüklü türlerin spektrumu ile +3 yüklü türlerin spektrumu kıyaslandığında, her iki spektrumda da bulunan iki komşu türün bir birine göre şiddetleri de çok büyük olasılıkla farklı olacaktır. Çünkü her bir peptidin +2 yüklenmeye yatkınlığı ile +3 yüklenmeye yatkınlığı arasındaki farkın tam olarak aynı olması beklenemez. Örneğin diğerinden belirgin ölçüde daha fazla histidin içeren peptit, +3 yüklü türlere ilişkin spektrumda +2 yüklüler spektrumuna göre daha yüksek şiddette bir pik oluşturacaktır. Bu tip gölge spektrumların birbiri üzerine düşüşünün engellenmesi ve her bir pikin ayrıntılı analizinin kolaylaşması amacıyla bu tip cihazlarda moleküllerin kat ettikleri yol elektrik ve manyetik yansıtıcılar kullanılarak uzatılır. TOF türü cihazlar MS/MS analizi için (polipeptit dizi analizi için) kullanılmak üzere TOF-TOF şeklinde organize edilebilirler. Böyle bir durumda çarpışma hücresi de iki bölüm arasına yerleştirilir (Şekil.20). Dört-kutuplu (Quadrupole) kütle spektrometreleri (Şekil.21) ise iyonların yolu çevresine yerleştirilmiş dört adet elektrot sayesinde iyonların istenilen belirli ve kararlı bir yörüngede hareket etmelerini sağlar. Böylece belirli bir m/z oranına sahip her tür farklı bir zamanda ve istenilen zaman aralıklarıyla çarpışma odasına yönlendirilir. Çarpışma odası çıkışında doğrusal bir iyon kapanı tarafından ikinci bir dört-kutuplu bölüme yollanan iyonlar buradaki değişken elektrik alanın etkisi ile m/z oranlarına göre ayrıştırılıp hedefe yollanır. Quadrupole-TOF denilen birleşik cihazlarda ilk analiz dört-kutuplu bir cihazda yapılırken (MS), MS/MS analizi için bir TOF düzeyi kullanılır (Şekil.22). İyon kapanı (Ion-trap) (Şekil.23) türü cihazlarda ise tuzaklama için kullanılan doğrusal iyon kapanlarının çalışmasına benzer biçimde ancak üç boyutlu bir elektriksel alan

denetimi sağlayarak m/z oranına göre ayrıştırmayı da iyon kapanı içinde yapan düzenekler bulunur. Belki de en gelişmiş ve hassas cihazlar olan FT-MS (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) (Şekil.24) türü cihazlarda ise fragmentasyon ve fragment analizi son derece güçlü süper mıknatıslar aracılığıyla ve manyetik rezonans tekniği kullanılarak gerçekleştirilir. FT-MS türü cihazlar şekilde de görüldüğü gibi iyonların daha etkin bir şekilde tuzaklanabilmesi amacıyla doğrusal bir iyon kapanı ile kombine bir şekilde de tasarlanabilir. Bu cihazlardan elde edilen verilerden sonuç üretilmesinde Fourier dönüşümü adı verilen bir matematiksel analiz yöntemi kullanılır. Cihazın adı da buradan gelir.

7.Verilerin İncelenmesi: Cihazdan ilk olarak zamana karşı alınan sinyal yeğinliğini gösteren bir 'toplam iyon akısı' ('total ion current / full mass spectrum') grafiği alınır (Şekil.25/a). Örnek, HPLC kolonu içerisinden kolonla en az etkileşenden en çok etkileşene doğru olacak şekilde çıkıp kütle spektrometresine girdiği için, bu ilk grafik temel olarak bu ilk ayrışmanın bir yansımasıdır. Spektrometre içine aynı anda giren, bir diğer deyişle HPLC kolonundan aynı anda çıkan bütün türler birkaç saniyeden birkaç on saniyeye varan bir zaman aralığı içerisinde detektöre ulaşırlar. Bu nedenle kütle spektrometresi içerisinde birbirlerinden ayrıştırılmış ve hatta ayrıştırılan her tür yolu üzerinde fragmente edilip, oluşan fragmentleri bile ayrıştırılmış da olsa, bu olaylar sırasında alınan tüm sinyaller dakika gibi bir zaman ölçeği üzerine çizilen bir grafikte yaklaşık olarak tek bir pik verecek şekilde birleşik görünecektir. Ancak bu grafik üzerindeki dar bir zaman aralığının ayrıntılı gösterimi (şekilde 42'nci dakika civarındaki, bir dakikadan kısa bir alan) bize o zaman aralığındaki polipeptit veya proteinler için daha geniş bir bilgi verir. Bu dar zaman aralığı için çizilen grafikler, alınan sinyalin yeğinliğinin, yük başına DALTON (Da) birimi şeklindeki kütle/yük oranı için fonksiyonu olacak şekilde elde edilir.(Şekil.26/a). Bu tür grafiklere, 'seçilen iyon akısı' ('extracted ion current') grafiği denir. Bu grafikteki kütle/yük oranı değerlerinde, protein veya peptitlerin kendi kütleleri yanı sıra pozitif yüklenirken aldıkları protonların kütleleri de ister istemez hesaba katılır. ESI'de Tripsin muamelesi ile elde edilmiş polipeptitler genellikle iki kez protone olmuş halde (+2 yüklü olarak) bulunurlar. Sonuç olarak spektrometre tarafından 1232,55 Da'luk bir peptidin m/z oranı $(1232,55 + (2 \times 1,0073 \text{ protonun kütlesi})) / 2 = 617,28$ olarak hesaplanacaktır. 15 amino asitten daha uzun polipeptitler veya fazladan protone olabilecek histidin gibi amino asitlerden fazlaca içeren polipeptitler ikiden fazla yüklenebilirler. (Şekil.26/b) Bu durum ilginç bir sorun yaratır. Grafiğimizdeki her hangi bir pik için, gerçek molekül kütlesi hesabında kullanacağımız yük sayısını nasıl belirleriz?

Örneğin şekil 26/a'daki 617,28'lik pik için +2 yüklü peptitlerden oluştuğunu ispatlamanın yolu nedir? Pek tabii 1848,8181 Da'luk bir peptidin +3 yüklü bir iyonu da olabilir $((617,28 \times 3) - (1,0073 \times 3 \text{ protonlar!}) = 1848,8181)$. Burada yardımımıza, her bir pikin bir birine çok yakın ama farklı m/z oranına sahip birer izotoplar kümesi şeklinde ortaya çıkışı koşturmaktadır. Doğal karbonun %1'i, karbonun 13 kütle numaralı ($^{13}\text{C}_6$) izotopu şeklinde bulunur ve doğal karbonun yaygın türü olan ^{12}C 'den 1Dalton daha ağırdır. Bu nedenle çeşitli polipeptitler tamamen rastlantısal olarak bir birlerinden birer Dalton daha ağır veya hafif olacak şekilde ortaya çıkarlar (örneğin bir kopya 3 tane ^{13}C içerirken diğeri 2 tane içeriyorsa aralarındaki fark yalnızca 1Da olur ve aynı şekilde 2 – 3 Da'luk farklar içeren moleküller de bulunabilir). Eğer şekildeki polipeptit +1 yüklü olsa idi, her bir dalton'luk fark m/z oranında bir birimlik bir değişikliğe neden olacaktı. Örneğin bu durumda şekil 26/a'daki kutucuk içerisindeki ayrıntılı gösterimde 617,28'lik pikin yanında ondan tam bir birim farklı pik veya pikler olacaktı; mesela 618,28. Bu pik gerçekten vardır, ancak 617,28'lik bir diğer pik ile birlikte! Aralarında 0,5 birimlik bir fark bulunan, ancak gerçekte bir birlerinden yalnızca birer Da'luk kütle farkı ile ayrıldığını bildiğimiz moleküllere ilişkin pikler kümesi, bize ilgili kütlelenin 2'ye bölündüğünü yani +2 yüklü olduğunu ispatlar.

Daha başka bir yük belirleme yöntemi, bir zemin gürültüsü kaynağından gelir. peptitlerle birlikte hareket eden Na^+ iyonunun yarattığı zemin gürültüsü şekil.42'de görülmektedir. Pikler arası m/z oranı farkının 22 birim olması ilgili iyonların +1 yüklü olduğunu ortaya koyar (Na^{23} , ancak $\text{M}+\text{Na}^+-\text{M}+\text{H}^+=22!$). Şekil.43'de ise şekil.42'deki spektrumun sağ tarafındaki piklerin daha ayrıntılı bir gösterimi vardır. Burada da doğal izotopik dağılım nedeniyle oluşan pikler kümesindeki her bir piki diğerinden ayıran m/z değeri 1'dir. Sonuç olarak deneydeki peptitlerin +1 yüklü olduğu her iki şekilde de kesin olarak söylenebilir. Belirtilmesi gereken bir diğer nokta, Potasyum iyonunun da ($^{39}\text{K}^+$) tıpkı sodyum iyonu gibi sıklıkla benzeri etkileşimlere girip kütlece 38 birimlik sapmalara yol açabildiğidir.

Tüm bu analizlerin yapılabilmesi kütle spektrometresinin çözünürlüğüne bağlıdır. TOF türü cihazlarda çözünürlüğün, m/z değerinin ilgili pikin genişliğinin yarısına bölünmesi ile elde edilen değer cinsinden verilecek olursa, 10.000 civarında olduğu söylenebilir. Böylece çok yüksek düzeyde yüklenmiş (yani pikleri arası mesafe son derece kısalmış) türler için bile önemli ölçüde net ve zemin gürültüsünden kolayca ayırt edilebilir piklerden oluşan bir grafik almak mümkün olabilmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi bu konuda en yüksek performans FTMS (veya FTICR-MS Fourier transform ion cyclotron resonance – MS) türü cihazla-

ra aittir. NMR'ların (Nükleer Manyetik Rezonansların) MS (kütle spektrometresi) analoğu olan bu cihazlarda çözünürlük kimi zaman 100.000'den yüksek değerlere ve kütle hassasiyeti de milyonda birlere kadar yükselebilir. Ancak bu cihazlardan elde edilen spektrumlar, cihazın çalışma ilkesine bağlı olarak diğer cihazlardan elde edilen spektrumlardan farklıdır (Şekil.25/b).

Buraya kadarki tüm işlemler MS olarak adlandırılır. MS/MS veya MS² olarak anılan ikinci bir kütle spektrometrisi (tandem MS) ise ilgili peptitlerin dizilerinin tespiti için kullanılacak olan spektrumu üretir (bazen yeterince ayrıntılı verilerin elde edilebilmesi için dizi analizinin yapılacağı spektrum birkaç parçalama basamağı sonucunda elde edilir – MS³, MS⁴... – ve bu durumda genel olarak MSⁿ ifadesi kullanılır [Şekil.27]). Sonuç olarak dizileme yapılabilecek bir spektrumun elde edilmesi amaçlanır. (Şekil.28). Bunun için ilk spektrumdaki belirli piklere karşı gelen peptitler ikinci bir basamakta parçalara ayrılır. Bu işlem genelde çarpışma hücrelerine alınan moleküllerin üzerine yönlendirilmiş eylemsiz (inörtlü) gazlar ile gerçekleştirilir. Bu amaçla azot molekülleri veya argon veya helyum atomları kullanılır. (Şekil.8 ve 29). Geliştirilmiş olan başka parçalama yöntemleri de vardır (örneğin, “ECD – electron capture dissociation / elektron yakalama ile ayrışma”, “SID – surface induced dissociation / yüzey etkinliği ile ayrışma” ve “ETD – electron transfer dissociation / elektron aktarımıyla ayrıştırma” gibi). Fakat “gaz fazında çarpışma etkinliği ile ayrıştırma (CID – collision induced dissociation)”, ticari tandem kütle spektrometrelerinde en geniş ölçekte kullanılan tekniktir. Parçalanmanın yapısı büyük ölçüde çarpışma enerjisine bağlıdır. İlk spektrumun elde edilmesinden önce istenmeyen parçalanmaların oluşumunun engellenmesi için (örneğin TOF türü cihazlarda) ilk iyon kapanı içindeki iyonların enerjileri 10eV civarında tutulur. Çarpışma hücrelerinde ise 60 – 70eV'a kadar çıkarılır. Doğaldır ki her tür cihaz için ve kullanım esnasında cihazın her bölgesi için kendine has enerji düzeyleri ile uygulama yapılır. Aynı şekilde çarpışma hücreleri içine doğru uygulanan eylemsiz gazın enerji düzeyi de hassasiyetle ayarlanır. Aslına bakılırsa, cihazların büyük çoğunluğunda düşük enerjili CID uygulaması yapılır (<100eV). Bunun sebebi kırılmaların peptit iskeletinde meydana gelmesinin amaçlanıyor olmasıdır. Daha yüksek enerji düzeylerinde ise amino asit yan zincirlerinde meydana gelen kopmalara ilişkin spektrumlar gözlenmektedir. Örneğin bir ‘gaz fazında CID’ uygulamasında He atomları ortalama 20eV'lık ve mümkün mertebe homojen bir enerji düzeyi ile yönlendirilirler. Bu enerji düzeyi dikkat çekicidir. Hidrojen atomunun iyonizasyon enerjisinin 13,6eV (313kcal.mol⁻¹) olduğu düşünülürse (ki olağan kimyasal reaksiyonlar, enerji alış verişi açısından her zaman bu değer altında kalır), çarpıt-

ğı polipeptitten çok daha küçük kütleli olan He atomunun aktarabileceği 1eV'dan bile daha düşük enerjilerin, ancak pek çok çarpışma neticesinde bir peptit bağını kırabilecek düzeye ulaşacağı görülebilir. Böylece sağlanan kontrollü enerji aktarımıyla aşırı ve düzensiz kırılmaların da önüne geçilmiş olunur. Bu işlem sırasında çarpışma hücrelerine giren iyon “öncü iyon” (*precursor ion*) MS² spektrumunu oluşturan iyonlara ise “ürün iyonlar” (*product ions*) denir (“ebeveyn / atasal” ve “evlat” iyonlar – *parent and daughter ions* – denildiği de olur). Burada dikkat edilmesi gereken, her bir MS² spektrumunun tüm peptit iyonları içinden sadece birine ait parçalanma ürünü iyonlardan oluştuğudur.

Burada ön önemli olgulardan birisi peptitlerin nasıl parçalandığı ve bu parçaların nasıl adlandırıldığıdır. Parçalanmış peptitlerin adlandırılması “Roepstorff – Fohlmann – Biemann Adlandırması” olarak anılır. (Şekil.30). En yaygın ve bilgi verici iyonları amino asitler arasındaki **amit veya peptit bağının kırılması** oluşturur. Yukarıda belirtilen nedenlerle yeni bir iyonlaşmanın olmadığı parçalanma işlemi sırasında var olan yükün amino terminali tarafında kalması ile “b” türü iyonlar, karboksi terminali tarafında kalmasıyla da “y” türü iyonlar oluşur. Quadrupole veya Quadrupole-TOF türü cihazlarda y-iyonları baskın halde bulunan tür iken, iyon kapanı türü cihazlarda hem b-iyonları hem de y-iyonları birlikte gözlenir.

De Novo Sequencing olarak bilinen bu dizileme çalışmalarında, hem yüksek hassasiyet ve süratin avantajları ile hem de pek çok teknik sorunun yarattığı sınırlamalarla karşılaşılır. Örneğin aralarında 114Da bulunan iki büyük pik ve bunların tam arasında bulunan 57Da'luk küçük bir pik nasıl değerlendirilir? Aradaki pik bir zemin gürültüsü olarak değerlendirilip 114Da'luk pik bir asparajin amino asidi olarak mı kabul edilmeli, yoksa bu bölge arka arkaya sıralanmış iki glisin amino asidi olarak mı değerlendirilmelidir? Uygulamada uzmanlar neyin zemin gürültüsü, neyin ise gerçek bir veri sinyali olduğunu çok büyük bir doğrulukla ayırt edebilmektedirler. Zemin gürültüsünün pek çok kaynağı vardır. Örneğin Şekil.31/a'da görülen son derece karmaşık bir “Toplam İyon Akısı” grafiği içinden elde edilen MS grafiğinde, ilgili peptit ile birlikte hareket etmiş olan bir Na⁺ iyonunun yarattığı zemin gürültüsü izlenebilmektedir (yukarıda belirtildiği gibi K⁺ iyonu da önemli bir diğer zemin gürültüsü kaynağıdır). Özellikle kimi proteinlerin belirli dizilerinin bazı iyonlara karşı yüksek ilgisinin olması doğal ve gerekli bir durum olup MS analizinde sorun yaratabilir. Yine izolasyon ve saflaştırma basamaklarında yapılacak eksiklik ve yanlışlıklar da çeşitli sorunlara neden olabilir (MS analizinin doğası gereği, bir açıdan sorun yaratan bir veri, diğer açıdan yarar sağlayabilir.

Örneğin buradaki Na^+ iyonları yukarıda da belirtil-diği gibi kütle belirlemede son derece yararlı ola-bilmektedir).

Aslında bazı spektrumların analizinde kar-şılaşılan sorunlar çok daha ciddi olabilmektedir. Örneğin şekil.31/b'de görülen spektrum, çeşitli "uydu iyonları" (*satellite ions*) içermesi nedeniyle ilginçtir. Buradaki tandem-MS spektrumu bir *Quadrupole-TOF* türü cihazdan alınmıştır. İki kez protone olmuş triptik FLYM(Ox)WPNA dizili peptide ilişkin öncül iyon, m/z 607,32'de izlenmek-tedir (grafikte yıldız ile işaretli pik / $M(\text{Ox})$; okside metiyonin). Öncü iyonun MS^2 spektrumunda gö-rülmesi normaldir, zira bu deneyde ürün iyonlar +1 yüklü iken öncü iyon +2 yüklüdür. Burada grafiğin altında kırmızı ile işaretlenen Y-M(Ox)-W serisi, dizi etiketidir (peptit etiketi). Ayrıca hemen tüm be-lirgin pikler y-iyonlarıdır. İyon kapanı türü bir cihaz kullanılsaydı veya peptitler dizileri içinde fazlaca bazik amino asitler içerselerdi, o zaman düşük güçte de olsa b-iyonlarına ilişkin pikler görmeyi beklerdik.

MS^2 analizinde önemli sorunlardan biri, prolin'in amino terminal peptit bağı ile aspartat'ın karboksi terminalindeki peptit bağının görece ka-rarsız olmasıdır. Bu nedenle bu bağların kırılması-nı ilgilendiren pikler, bunlardan önceki ve sonraki bağların kırılmasıyla ilişkili piklerden daha şiddetli olurlar (yani ilgili peptidin dizisi içinde oluşabilecek kırılmalar rasgelelikten uzaklaşır, bu da dizi anali-zini güçleştirir. Yukarıdaki benzetmeyi sürdürürsek, Sanger dizi analizinde belirli bazı dizilerdeki birkaç nükleotidde hiç terminasyon olmamasının yarata-cağı sorunlara benzer nitelikte sorunlar meydana gelebilir). Aslında prolin'in karboksi terminalinin ve aspartat'ın amino terminalinin kırılması, enerji ola-rak elverişsizdir. Bu bölgelerde daha az kırılma gö-rülmesinin ve diğer taraftaki bağların daha karar-sızca davranmasının sebebi de budur (şe-kil.31/b'deki 457,26 ve 359,19 olarak sıralanan m/z değerlerine ilişkin piklerin şiddetlerini kıyaslayı-nız!).

Bir diğer sorun belirli bir bölgeden itibaren tüm spektrumu değiştirebilir. Eğer çeşitli yan zincir modifikasyonları varsa (serin / treonin fosforilasyonu ve/veya metiyonin oksidasyonu gibi) bu modifikasyonu taşıyan fragment iyonları "uydu iyonlar" (*satellite ions*) diye anılacak şekilde bekle-nenden farklı kütlelerde ortaya çıkarlar (örneğin fosfat grubu için 98Da ve $-\text{CH}_3\text{SOH}$ için 64Da'luk farklar şeklinde ortaya çıkarlar). Uydu iyonların verdiği piklerin şiddeti ile beklenen piklerin şiddeti arasındaki görece oran, modifikasyonun sıklığına işaret eder. Burada unutulmaması gereken şey modifiye amino asidi içeren tüm fragmentlerin uydu iyon şeklinde davranacağıdır. Böylece modifikas-yon noktasından itibaren tüm spektrum, bu modifi-

kasyonun izlerini taşır. Tabi, daha başka bir modi-fikasyon daha ileri bir bölgede meydana gelmişse, o zaman spektrumun ilerleyen bölümleri iyice kar-maşıklılaşır. Zira her iki modifikasyona ilişkin kay-malar üst üste birikerek analizi zorlaştıracak ölçü-de beklentilerden sapma yaratırlar.

Bir diğer sorun da bazı fragmentlerin bek-lenen yüklerde olmamalarından ileri gelir. Örneğin yine şekil.31/b'deki kırmızı okla işaretli pik, aslında m/z değeri 953,44 olan fragmentin +2 yüklü türe-vidir. Aslında bazı fragmentlerin su veya amonyak kaybetmesi ile de uydu iyonlar oluşabilir. Bu du-rumda bunlar türüne göre; $a_n\text{-NH}_3$ veya $y_{n-m}\text{-H}_2\text{O}$ şeklinde adlandırılır. Genel olarak iki değerli peptit iyonları ile MS^2 analizine başlanan sistemlerde tek yüklü "y" ve "b" türü iyonlar oluşur. Ancak oluşan b-iyonların bir bölümü karbonil grubu (C=O ; kütle farkı, 27,9949Da) yitirerek a-iyonlarına dönüşebilir-ler (CO , çok kararlı bir bileşiktir!). Bu durum b-iyonlarına ilişkin piklerin şiddetini azaltır.

Son olarak belirtilmesi gereken şey ise (belki de ilk söylenmesi gereken şey), MS/MS ana-lizindeki esas zorluğun izobarik (eş kütleli) olan lösin ve izolösin amino asitleri ile çok yakın kütleli lizin ve glutamin amino asitlerinden kaynaklandı-ğır (Şekil.1).

Veri Tabanı Taraması De Novo Dizilemeye Kar-şı:

Araştırmacılar 1990'ların başından itibaren peptit dizileme probleminin, çözümünü çok daha ko-lay bir veri tabanı karşılaştırma problemine dönüş-türülebileceğini fark ettiler. Aslında üç saatlik bir MS analizinde, her saniye 4 fragment spektrum-u alınır toplamda 43.000 spektruma ulaşıldığı gerçeği bile dizileme çalışmalarında kompleks ya-zılımlar kullanmanın önemini ortaya koyar (bir in-ternet sitesinde belirtildiği gibi; "eğer her bir deney için yüz tane lisans üstü öğrenciniz yoksa, bilgis-a-yar kullanmanız önerilir"). Fakat veri tabanı karşı-laştırma tekniğini *de novo* dizilemeden daha kolay kılan asıl gerçek, doğada bulunabilecek amino asit dizilerinin ancak aşırı ölçüde küçük bir kesiminin gerçekte var olduğudur. Yani bir proteinden elde edilen bir peptit parçasının amino asit dizisi o pro-teine ilişkin tüm verileri içermese de onun kimliğini bir veri tabanı karşılaştırması ile ortaya koyabile-cek kadar "tek" olabilir. Burada unutulmaması ge-reken, veri tabanı karşılaştırmasının ancak bir veri tabanı oluşturulabilecek şekilde genom dizilemesi yapılmış bulunan canlılar için uygulanabilir oldu-ğudur. Genomik diziler sayesinde olası polipeptit ürünleri belirlenebilir ve bunlara ilişkin teorik birer MS ve MS^2 spektrumu geliştirilip karşılaştırma için kullanılabilir. Bu durumda ilgili canlının her hangi bir protein izolatu için genel protein içeriği tarama-sı, veri tabanı ile karşılaştırılan polipeptit parçası

dizileri ile sağlanabilir. MS² spektrumunu pek çok farklı algoritmaya göre veri tabanı ile karşılaştırıp sonuç üreten çeşitli yazılımlar mevcuttur (Peptide-Search, Sequest, Mascot, Sonar ms/ms, ve ProteinProspector gibi). EST (expressed sequence-tag) projeleri bitmiş canlılar için daha düşük bir derecede olsa da veri tabanı karşılaştırması yapılabilir. Böyle bir durumda evrimsel olarak yakın akraba ve dizileme çalışmaları tamamlanmış olan türlerin proteomları ile gösterilen yoğun homoloji, kullanışlı bir araç haline gelir. Bazen bilinen genomlara ait proteom analizinde “mass fingerprinting” veya “peptide mass fingerprinting (PMF Analysis)” denilen bir parmak izi analizi kullanılır. “MALDI-fingerprinting” de denilen bu yaklaşım temel olarak veri tabanındaki her protein için triptik peptitleri belirleyip bunlar için teorik bir spektrum üreterek bu spektrumu elde edilen MS spektrumu (Şekil.26) ile karşılaştırma mantığına dayanır. Fakat pek çok durumda daha özgül ve duyarlı bir tanımlama metodu olan “LC-tandem-MS (MS²)” peptit dizilemeye (Şekil.9 ve 28) ihtiyaç duyulur.

Veri tabanı karşılaştırmasının da kendine has zorlukları ve sınırlamaları vardır. Örneğin birkaç farklı peptit istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek bir güvenilirlikle aynı proteine işaret ediyorsa daha ileri çalışmalara gerek duyulmaksızın ilgili proteinin tanımlanmış olduğu kabul edilir. Fakat görünüşte önemli ölçüde yüksek bir skor veren eşleştirmeler, bazı çok büyük proteinlerin tespitinde hatalı sonuçlar üretebilmektedirler. Bunun sebepleri, büyük proteinlerin hem çok fazla sayıda teorik peptit oluşturup son derece karmaşık bir spektrum üretmesi hem de pek çok korunmuş dizisine ilişkin spektrumların başka proteinlerce de oluşturulabilir olmasıdır. Dahası özellikle 7 amino asitten daha küçük peptitler veri tabanında birden fazla sayıda proteinle uyuşup sorun yaratabilirler (7 a.a. = 21 nükleotid; daha kısa polipeptitlerin genom içinde tek bir bölgeye özgü olma ihtimalinin azalışı bu mantıkla daha kolay takip edilebilir). Tüm bu sebepler, gerçek durumu burada anlatıldığından daha karmaşık hesaplamalar gerektirecek hale getirmektedir (Şekil.41).

Bir diğer kısıtlama da genelde sadece “tam triptik” peptitlerin veri tabanı taramasında kullanılabilir oluşudur. Böylece oluşan tüm peptit parçalarının karboksi terminalinde arjinin veya lizin amino asidinin olacağı önceden bilinir. Bunun nedeni tripsin’in tam olarak dizi özgül bir proteaz olması ve son derece az sayıda ‘kısmi-triptik’ ürün oluşumuna sebep olmasıdır. Bu sayede teorik spektrumların oluşturulması ve farklı uygulamalar arasında bir kalibrasyon sağlanması kolaylaşır.

Veri tabanı aracılığıyla tanımlama bir birden farklı yaklaşımlarla yapılır. Her bir yöntemin uygulanışında kullanılan algoritmalar da farklıdır.

Temel olarak üç değişik yaklaşımdan bahsedilebilir. “Peptide Sequence Tags” (PST) olarak da bilinen bir yaklaşım ve ilgili algoritma, ilk olarak “PeptideSearch” programı tarafından kullanıma sunulmuştur. Bu teknik 90’ların ortasında, EMBL’nin Heidelberg Almanya’daki ‘Protein ve Peptit Grubunda’ çalıştıkları sırada Matthias Mann ve Matthias Wilm tarafından geliştirilmiştir. Buradaki temel mantık, parçalanma spektrumu içinde çoğu zaman için kolayca tespit edilebilecek dizilerin küçük bir serisinin var olduğu gerçeğidir. Örneğin Şekil.32’deki gibi seriler bir ‘amino asit etiketi’ içerirler. Bu etiket ilgili piklerinden kolayca tanımlanabilecek iki veya üç amino asitlik bir bölgedir.

Böylece bir PST tipik olarak üç bölgeden oluşur. Merkezi amino asit etiketi ve bu etiketin her iki tarafında bulunan birkaç amino asitlik bölgelere ilişkin kütle verisi (Şekil.32/a’da m1 ve m3) (Doğal olarak böyle bir analizden önce ilgili peptidin nötral kütlesi olağan MS spektrumundan tespit edilmelidir). Sonuç olarak bu özellikte ve bu sırayla dizilmiş üç bölgeye sahip olan veri tabanı dizisi ile yapılacak kıyaslama ile tespit gerçekleştirilmiş olur. Yöntemin gücü Şekil.32/b’nin incelenmesi ile daha net görülebilir. Burada karmaşık bir spektrumun, nasıl belirtildiği gibi üç ana bölümden oluşan ve kolay kıyaslanabilir bir yapı haline dönüştürüldüğü daha açık olarak izlenmektedir. Bu şekilde, nötral kütlesi 1378,8 olan atasal peptide ilişkin spektrum, (772,4)LVV(1083,6) şeklinde bir dizi etiketi halinde organize edilmiştir. Bu yöntem aynı zamanda bir homoloji tarama yöntemi olarak da işlev görür. Eğer program üç bölgeden ikisi için eşlik aranacak şekilde çalıştırılır veya normal olarak böyle sonuç verirse, bir ekson veya domain shuffling (karıştırma) olayı tespit edilebilir. Ayrıca bu yöntem uzunca bir süre boyunca eldeki ilk ve tek ücretsiz yazılım olduğu için yoğun olarak kullanılmış ancak pek çok uygulamanın manuel olması, yaygınlığını ve popüleritesini azaltmıştır. Son zamanlarda bu tekniği kullanan yazılımların otomasyon düzeyi artmıştır.

İkinci temel yaklaşım ise Sequest algoritması adı altında piyasaya sunulmuştur. Buradaki temel mantık deneysel olarak elde edilmiş MS² spektrumunun, eldeki veri tabanında bulunan polipeptitlerin triptik kesim ürünlerinin verebileceği teorik spektrumlar ile karşılaştırılmasına dayanır. Yapılan otokorelasyon ile geliştirilen her teorik spektruma bir skor verilir. Diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilecek kadar yüksek bir skor alan spektruma ilişkin dizi deneysel spektruma kaynaklık eden polipeptidin dizisi olarak kabul edilir. (Şekil.33) Bu teknik özellikle düşük sinyal/gürültü oranına sahip spektrumlardan sonuç üretilmesinde güçlü bir uygulamadır. Zira böyle düşük çözünürlüklü bir spektrumun aksine yüksek çözünürlüklü bir spektrumun kullanılması durumunda, ilgili algoritma tarafından gerçekleştirilme-

ye çalışılan otokorelasyon işlemi, bilgisayar için son derece iş yoğun bir yöntem haline gelmekte ve sonuç üretilmesi zorlaşmaktadır. Bunun sebebi açıktır. İyi bir uzman için kolayca zemin gürültüsü olduğu anlaşılabilecek pek çok pikin keskin görüntüsü, yüksek çözünürlüklü bir spektrumu, bilgisayar için teorik spektrumla karşılaştırıldığında son derece yetersiz bir benzerlik ilişkisi kurulmasına yol açacak şekilde karmaşıktır. Bu nedenle belirgin sinyaller üreten hedef peptit parçalarından başka tüm zayıf sinyallerin arada kaybolacağı ölçüde düşük bir çözünürlük düzeyi, Sequest algoritması için en verimli düzeydir.

Üçüncü ana yaklaşım ise Mascot isimli bir arama motoru tarafından piyasaya sürülmüştür. Olasılık tabanlı eşleştirme diye de anılan bu yöntem, veri tabanındaki tüm peptitlerden teorik olarak oluşması beklenen bütün olası peptit parçalarının hesabına dayanır. Bu algoritmada beklenen fragmentler, deneysel fragmentlerle bir 'yukarıdan aşağıya' mantığı ile eşleştirilirler (Şekil.34). Bunun için veritabanındaki peptitlerin verebileceği olası parçalar, MS² spektrumundaki en belirgin piklere karşılık gelen 'b' ve 'y' türü iyonlar için tek tek değerlendirilir. Burada unutulmaması gereken şey, en yeğin piklerin her zaman için 'b' ve 'y' türü iyonlara ait olmayabileceğidir. Ancak teorik olarak belirlenen peptit parçalarından, teorik olarak üretilen bir tandem-MS spektrumunun deneysel MS² spektrumu ile karşılaştırıldığı Sequest algoritması ile kıyaslandığında, bu algoritmanın iki farkı görülmektedir. Birincisi teorik basamaklardan biri (teorik spektrum üretme basamağı) ortadan kaldırılarak daha gerçeğe yakın karşılaştırma değerleri üretilmeye çalışılmış, ikinci olarak ise zemin gürültüsünün yarattığı sorunları azaltabilecek şekilde, deneysel tandem-MS spektrumu doğrudan doğruya ilgili olabileceği dizi ile karşılaştırılarak, daha düşük işlem yükü ile olası benzerlik ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak bu yöntemde de tüm karşılaştırmalar birer skor ile nicelleştirilir ve değerlendirmeye alınır.

MS² veri tabanı karşılaştırma analizleri esnasında ortaya çıkan yanlış tanımlamalar pek çok farklı sebebe dayanır. Bunların başında, sonuçlar üzerinde ayrıntılı değerlendirmeler ve geri dönüşler yapılarak hata giderme imkânının kısıtlı olduğu ve bazen tek bir deneyde binlerce peptidin tanımlandığı geniş ölçekli proteomik dizileme projeleri gelir. Sonuç olarak bu çalışmalarda nicel değeri bilinmeyen, fakat açıkça diğer analizlerden daha yüksek olan bir hata oranı vardır. Ancak hata oranının ve düzeyinin belirlenmesine yönelik çalışmalar da yapılmaktadır. Keller *et al.* 2002 yılında yayınladıkları "Experimental protein mixture for validating tandem mass spectral analysis" (Omic 6, 207-212) başlıklı yayınlarında, hata oranı ve düzeyini belirlemek için deneysel bir yaklaşım geliştirmişlerdir.

Araştırmacılar bu amaçla rekombinant proteinlerden oluşan bir karışım kullanmışlar ve pek çok defa LC-tandem-MS (MS²) deneyi uygulayarak protein tanımlaması yapmışlardır. Sonuç olarak, peptit tanımlamada kullanılan pek çok giriş kriteri için yanlış pozitif ve yanlış negatif oranlarını belirlemişlerdir. Bu tip çalışmaların en önemli yanlarından birisi de farklı yazılımlar ve farklı laboratuvarlarca gerçekleştirilen deneylere ilişkin sonuçları, kıyaslanabilir şekilde kalibre etme imkânı yaratmasıdır. Yine de tek peptide dayalı tanımlamaların ve tam triptik olmayan peptit karışımları kullanımının, yanlış pozitif protein tanımlama olaylarının en büyük sebebi olduğu bilinmektedir.

Aslına bakılırsa, veri tabanı oluşturma veya hazır veri tabanlarını kullanma bile başlı başına bir uzmanlık alanıdır. Bu alan bugün tamamen "in silico" olarak, yani bilgisayar üzerinde gelişmektedir. Özellikle genomik dizilerden olası polipeptitleri tahmin edip dizilerine ulaşma, bugün hala gelişen bir çalışma alanıdır. Veri tabanları ise son derece büyüktür. Örneğin bir proteinin dizisini ve bu veriyi kullanacak olan program için gerekli giriş bilgilerini taşıyan başlangıç işaretlerini içeren üç adet örnek veri tabanı satırı aşağıda verilmiştir.

```
snew|Q9Y530IMM_  Ç BQ96F23|Q96F23 Hypothetical
prot
Homo sapiensMM_2 produc
$MASSLNEDPEGSRTYVKGDLFACPKTDSLACISEDRCRMG
AGIAVLFFKKKFGGVQELLNQKKSGEAVLKRDRYIYYLITK
KRASHKPTYENLQKSLEAMKSHCLKNGVTDLSMPRIGCGLD
RLQWENVSAMIEEVFEATDIKITVYTL// #
```

```
snew|P22682hydr $F- TM CBL E3 ubiquitin protein ligase
Mus musculusydrase, chl
"MAGNVKKSSGAGGGGSGGSGAGGLIGLMKDAFQPHHHH
HHLSPHPCTVDKMMVEKVCWKLMDKVVRCLQNPKLALKNSP
PYILDLLPDTYQHLRTVLSRYEGKMETLGENEYFRVFMENLM
KKTQKTISLFKEGKERMYYEENSQPRRNLTKLSLIFSHMLAELK
GIFPSGLFQGDTRITKADAAEFWRKAFGEKTIVPWKSFRQA
LHEVHPISSGLDAMALKSTIDLTCNDYISVFEDIFTRLFQPWS
SLLRNWNLSLAVTHPGYMAFLTYDEVKARLQKFIHKGPSYIFR
LSCTRLGQWAIGYVTADGNILQTIHPNKLPLFQALIDGFREGFY
LFPDGRNQNPDLTGLCEPTQDHIKVTQEYELCYCEMGSTF
QLCKICAENDKDKIEPCGHLMTCTSLTSWQSEGGQCPFC
RCEIKGTEPIVDPFDPGRSGSLLRQGAEGAPSPNYDDDDDD
ERADDLSLMMKELAGAKVERPSSPFSMAPQASLPPVPPRLD
LLQQRAPVPASTSVLGTASKAASGSLHKDKPLPIPTRLRDLPP
PPPPDRPYSVGAETRPQRRPLPCTPGDCPSRDKLPPVPSSR
PGDSWLSRPIPKVPVATPNPGDPWNGRELNRHSLPFLPS
QMEPRADVRLGSTFSLDTSMTMNSSPVAGPESEHPKIKPS
SSANAIYSLAARPLPMPKLPPGEQGESEEDTEYMTPTSRPV
GVQKPEPKRPLEATQSSRACDCDQIDSCITYEAMYNISQSA
LSVAENSASGEGNLATAHTSTGPEESENEDDGYDVPKPPVP
AVLARRTLSDISNASSFGWLSLDGDPNTNFNEGSQVPERPP
KPFPRRINSERKASSYQQGGGATANPVATAPSPQLSSEIERL
MSQGYSYQDIQKALVIAHNNIEMAKNILREFVSISSPAHVAT//
```

```
snew|Q9Z6M3mate Å 3-dehydroquinate synthase (EC
4 Chlamydomophila pneumonia
~MMSETIITPHVVKLISNFFQKKLFSSISTAYPLVIITDVSQV
QHLLGPILDHIKMLGYQVIVLTFPPGEPNKTWETFISLQYQLV
DQNIISPSSIIIGGGTVLDMTGFLAATYCRGLPLYLIPTTITA
MVDTSIGGKNGINLRGIKNRLGTFYLPKEVWMCPQFLSTLPR
```

EEWYHGIAEAIKHGFIADAYLWEFLNSHSMKLFSSSQILHEFIK
RNCQIKAAIVAEDPYDRSLRKILNFGHSIAHAETLAKGTVNHG
QAVSVGMMIETRISLAEGVMKTPQLIDQLERLLKRFNLPSTLK
DLQSVPEHLHNSLYSPENIYTLGYDKNLSQHELMIMIEHL
GRAAPFNGTYCASPMEILYDILWSECHVMRHC//

Bu satırların alındığı veri tabanında (PeptideSearch EMBL/EBI [European Bioinformatics Institute]'a ait "non-redundant protein database [nrdb]" isimli veri tabanında), böyle 750.000'den fazla sayıda farklı diziye ilişkin veri vardır (559.618.375 bayt / FASTA formatındaki veri tabanının büyüklüğü 700Mb). Ayrıca bu veri tabanı kamuya açık olup ücretsiz olarak indirilebilmektedir. Aşağıda bazı veri tabanı tarama programları ve edinilebilecekleri internet adresleri verilmiştir.

1. Mascot <http://www.matrixscience.com/>
2. Masslynx <http://www.waters.com/>
3. MS-Tag/MS-Seq <http://prospector.ucsf.edu/>
4. PeptideSearch <http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/Homepage.html>
5. PepFrag <http://prowl.rockefeller.edu/PROWL>
6. ProBID <http://projects.systemsbiology.net/probid>
7. SEQUEST <http://fields.scripps.edu/>
<http://www.thermo.com/>
8. SpectrumMill <http://www.chem.agilent.com/>
9. X!Tandem <http://www.thegpm.org/TANDEM/index.html>

Post-Translasyonel Modifikasyonlar:

Post-translasyonel modifikasyonlar (PTM'lar) proteinlerin hem etkileşimlerini hem de görevlerini önemli ölçüde etkileyen değişikliklerdir. Bu nedenle tespitleri büyük önem taşır. Ancak bu zorlu bir iştir. Çünkü MS analizinde bu tür değişiklikler, genellikle karmaşık sinyaller üretmeye eğilimlidirler. Belirli bazı modifikasyonların özgül kütleleri dolayısıyla tıpkı bir amino asit gibi belirlenmeleri olasıdır (bazı prostetik gruplar gibi), fakat çoğu durumda böyle belirgin işaretler oluşmaz.

Bir proteinin bütün olası izoformlarının MS analizi ile belirlenmesi mümkün olmayabilir. Bazen tek bir amino asit değişikliği bile belirgin bir kütle farkı yaratması nedeniyle bir izoformu ortaya koyabilir (izolösün / lösün durumu haricinde), fakat alternatif splay veya protein processing gibi olaylar için bu kural işlemez, çünkü bu durumda elimizde, veri tabanı ile örtüşmeyebilecek yeni bir amino asit dizisi vardır. Bu tür PTM'ların tespiti için hem veri tabanlarının gelişmesine hem de karşılaştırma yazılımları alanında yeni çalışmalar yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

Fosforilasyon, glikozilasyon ve metilasyon gibi PTM'ların tespiti ise görece daha kolaydır. Bunun için önce HPLC gibi klasik yöntemlerle modifikasyonun türü belirlenip sonradan bu modifikasyonun MS yardımı ile haritalaması yapılabilir (Şekil.44). Kimi PTM'lar MS koşullarına dayanıklı olup bunların analizi doğrudan doğruya tandem-MS ile

yapılabilir. Bunun için kütleleri nedeniyle oluşacak kaymalar dikkate alınır (Tablo.3). Şekil.45'de kare içinde görülen spektrum, MS'de kırılğan olduğu bilinen glikozilasyon türü PTM'ların, CID türü bir fragmentasyon tekniğinin kullanıldığı MS/MS analizi ile tespitini göstermektedir. Burada muhtelif heksoz birimlerinin kaybı ilgili PTM'un tespitine imkân vermiş, fakat ilişkili olduğu peptit parçasındaki konumu belirlenememiştir. Şekil.45'in genel grafiği ise "ECD – Electron Capture Dissociation" fragmentasyonu ile bir FTMS türü cihazda gerçekleştirilen deneyin sonuçlarını yansıtmaktadır. ECD tekniği halen bilinmeyen bir mekanizma ile çok kırılğan PTM'ların bile bağlı kalmasını ve konumlandırılmalarını sağlamaktadır. Buradaki grafikten 'HexNAc₁Hex₁NeuNAc₂' şeklindeki bir glikozilasyonun ve toplamda beş fosforilasyon ile üçü O- ve biri de N-bağlı glikozilasyonun tespiti mümkün olmuştur.

Nicel Proteomik ve Kütle Spektrometrisi:

MS analizi, özellikle çok az miktarlardaki proteinlere uygulanabildiği için son derece düşük derişimdeki proteinlerin tespitinde önemli başarılar sağlayan bir tekniktir. Bazı durumlarda, klasik yöntemlerle tespit edilme sınırının altındaki proteinler bile belirgin bir MS spektrumu vermeleri nedeniyle henüz izole edilmeden önce tanımlanırlar. Bu, proteomiğin hedefleri açısından çok büyük bir gelişmedir. Fakat pek çok proteinin işlevi çoğu zaman derişimine bağlıdır ve bu da sadece nitel değil aynı zamanda nicel bir analizi de gerekli kılar. İşte bu nicel analizlerin kütle spektrometresi kullanılarak yapılabilmesi için bazı yöntemler geliştirilmiştir.

MS spektrumundaki pikin şiddeti doğrudan doğruya detektöre ulaşan iyon miktarına bağlı olsa da bu miktar, o proteinin kaynaktaki miktarı ile doğrusal ilişkili değildir. Bunun nedeni söz konusu proteinin örneğin diğer bir proteine nazaran daha az olan çözünürlüğüne bağlı olarak daha az tripsin etkinliği altında kalmasından veya diğerlerinden daha farklı bir iyonizasyon etkinliğine sahip olmasından kaynaklanabilir (iyonizasyon etkinliği; çözültideki peptitlerin, gaz fazında iyonlara dönüştürülebilir kesri ile tanımlanır). Neyse ki, tüm bu parametreler hesaplanabilir niteliktedir ve böylece spektrumdaki veriden proteinlerin görelî miktarlarına belirli bir hata oranıyla olsa da ulaşmak mümkün olabilmektedir. Doğaldır ki bir 'mutlak miktar belirleme' deneyinin en akılcı yolu bir 'iç standart' ('internal standard') molekül kullanmaktır. Bu amaçla, enzim kesimi sonucu oluşması beklenen peptitlere benzer biçimde olan ve miktarı bilinen bir peptit kullanılır. Ancak miktarı tam olarak bilinen bu peptidin, deneysel peptitlere ait spektrumla girişim yapmayan buna rağmen kolayca da tespit edilebilecek bir spektrum oluşturabilmesi için her

tür peptitten biraz farklı bir kütleyle sahip olması gerekir. İşte bu amaçla farklı kütleli kararlı izotoplar kullanılır (mesela iç standardın içerdiği karbonlar, en azından bazı amino asitler için, ^{13}C şeklinde tasarlanır). Kaçınılması gereken uygulamalardan biri, iç standart olarak de-metile (-14) veya hidroksile (+16) analogların kullanılmasıdır. Zira bunlar, atasal bileşiklerin doğal olarak bulunan metabolitleri arasında, kütle kayması gözlenmesine sebep olabilecek en yaygın türlerdir. Sonuçta iç standart'a ilişkin pik, doğal olarak bulunan bu metabolitler ile girişim yaparak çok daha şiddetli görünebilir.

Çoğu zaman, proteomik çalışmalarında görelî miktar tayini, mutlak miktar tayininden daha önemli olur. Örneğin farklı koşullar altında, ilgilenilen belirli proteinlerin miktarlarında nasıl bir değişim meydana gelmektedir? Hücreler değişen çevresel koşullara veya çeşitli kimyasallara nasıl tepki vermektedir? Tüm bunlar son derece hayati sorulardır ve çözümleri görelî miktar tayini gerektirmektedir. Aşağıda sıralandığı gibi bu amaçla kullanılan belli başlı üç yaklaşım vardır (Şekil.35). Bunların hepsi kararlı izotopların kullanımına dayanır ($^1\text{H} \leftrightarrow ^2\text{H}$, $^{12}\text{C} \leftrightarrow ^{13}\text{C}$, $^{14}\text{N} \leftrightarrow ^{15}\text{N}$ ve $^{16}\text{O} \leftrightarrow ^{18}\text{O}$ değişimleri). Sonuçta aynı peptidin farklı kaynaklarına ait olduğu bilinen piklerin şiddetleri arasında yapılan bir oranlama, ilgili proteinin kaynaklar arasındaki görelî oranını yansıtır.

1.Enzim Reaksiyonu Aracılığıyla Kararlı İzotoplar ile İşaretleme: Bu teknikte bir biri ile kıyaslanmak istenen iki farklı hücre popülasyonundan alınan proteinlerden biri normal ortamda tripsin ile kesilirken, diğeri ağır sulu ortamda kesilir. Ardından iki örnek karıştırılarak birlikte MS analizine yolandırılır. Hidroliz esnasında peptide aktarılan ağır izotoplar nedeniyle oluşan özdeş peptit serilerinden her biri iki farklı spektrum üretecektir. Bu ikişerli spektrumlardaki piklerin bir birleri ile oranları ilgili proteinlerin geldikleri kaynaklardaki görelî oranlarını yansıtacaktır. Fakat bu yöntemin en ciddi sorunu, olabilecek en ağır (ve radyoaktif olmayan) suyun kullanılması durumunda bile ($^2\text{H}_2\text{O}^{18}$) iki özdeş peptit arasındaki mesafenin en çok 4Da'la sınırlı olmasıdır. Bunun sorun oluşunun sebebi şudur; her bir peptit, spektrum üzerinde yukarıda anlatıldığı gibi bir izotopik pikler kümesi şeklinde bulunur. Bu doğal ve işe yarayan durum, burada ilgili pikler kümelerinin iç içe geçmesine neden olarak sorun yaratabilmektedir. Bu nedenle, bu tip çalışmalarda genel olarak işaretli peptit ile doğal peptit arasında en azından 3 kütle/yük birimi kadar bir farkın olması istenir. Bu yöntemde ise H_2O^{18} lı su kullanılması durumunda, her peptidin karboksi terminaline 2Da'luk bir fazladan kütle aktarılmış olur ki, +2 yüklü bir peptit için bile MS spektrumunda 1m/z birimi kadar fark oluşturulabildiği için izotopik pikler kümelerinin iç içe girmesi kaçınılmaz olur. İki başından da kesilmiş peptitlere,

hem amino terminaline iki adet ^2H (Döteryum) (biri amino grubunu $-\text{NH}_3^+$ şeklinde bir yapıya taşıyacak $^2\text{H}^+$ çekirdeği) ile hem de karboksi terminaline ^{18}O ile toplamda 4Da kütle kazandırılması durumu bile çoğu zaman yetersiz kalabilmektedir.

2.ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) İzotopik İşaretili Kimyasal Etiket ile İşaretleme: Bazen 'hasat sonrası işaretleme' ('post-harvest labeling') olarak da adlandırılır. Bu amaçla sıkça kullanılan tekniklerden biri, bir biotin grubu ile bir sistein amino asidinin iki farklı kaynağa ait protein örnekleri için farklı izotoplarla işaretli birer köprü ('linker') molekül ile bağlanmasıdır (Şekil.36). Kimyasal olarak birleştirilen bu etiketlerin kütleleri tasarlanıp istenilen m/z oranı farkları elde edilebilir. Fakat bu tekniğin de bazı sınırlamaları vardır. Örneğin sistein içermeyen peptitler bu şekilde işaretlenemezler. Dahası kimyasal işaretleme zaman alıcı ve hassasiyet isteyen bir çalışma gerektirdiği için pek tercih edilmez. Yine de SILAC uygulamasının yapılamadığı insan biyopsilerinde kullanım için son derece önemli bir tekniktir.

3.SILAC (Stable-Isotope Labeling in cell Culture) Hücre kültüründe Kararlı İzotoplar ile İşaretleme: Bu amaçla kullanılan tekniklerin içinde belki de en güçlüsü SILAC'tır. Bu yöntem ilk olarak iki farklı ekip (Langen ve meslektaşları ile Chait ve çalışma arkadaşları) tarafından tanıtılmıştır. Yöntem, temelde hücre kültürlerini besi ortamlarına katılan farklı kütleli izotoplar ile metabolik olarak işaretlemeyle dayanır. Böylece hiçbir kimyasal reaksiyon basamağı içermeyen ve istenilen m/z oranı farklarına sahip spektrumlar üretecek izotopik işaretli peptitler elde edilmiş olunur. Bu amaçla, genel olarak seçilen bir veya iki amino asit için ^{13}C veya ^{15}N ile işaretli türleri, seçilen hücre hattının besi yerine katılır ve tam olarak proteinlerin yapısına katıldıklarında izolasyona geçilir.

Bu yöntemlerin hepsinde iki farklı kaynaktan gelen örnekler karıştırılarak MS analizine yönlendirilir. Böylece spektrumlardaki şiddetler arası kıyaslama aynı deneye ait grafik(ler) üzerinde yapılır (Şekil.35 ve 36'daki grafikler). Tüm bu uygulamaların sağlıklı sonuç üretebilmesi için temel ve vazgeçilmez olan iki konu vardır. Bunlar, %100 işaretleme ve kaynak hücre hatları arası özdeşliğin korunmasıdır. Şöyle ki, eğer işaretleme yöntemlerinden her hangi biri %100'den farklı bir işaretleme oranına sahip olursa, işaretleme ve dolayısıyla diğer kaynaktan gelen peptitlerin piki içinde onların şiddetlerini artıran bu peptitler yeni bir belirsizlik yaratacaklardır. Yine hücre hatları arası kontrol kaybedilirse, belirli bir proteinin, örneğin 2 numaralı hücre hattında gerçekten daha çok mu ifade edildiğini, yoksa bunun sadece bu hücrelerden daha çok protein izole edilmiş olmasından mı kaynaklandığını anlama imkânı kalmaz. Bu hataya

düşmemek için izolasyon kaynakları hassas biçimde eş tutulur ve izolatlar her basamakta aynı işlemleri görür. Sonuçta ortaya konulan farklılıkların genetik ifade ve degradasyon hızı gibi etkenlerce belirlenen gerçek göreceli oranı yansıtması hedeflenir. Bu amaçla tüm bu deneyler işaretlemelerin ters çevrilmesi ile tekrarlanabilir.

Özellikle sağlık alanında miktar tayini çok önemlidir. Çünkü proteinler çoğu hücresel faaliyet için etkin bileşenlerdir ve mRNA popülasyonlarına ilişkin miktar bilgisi çoğunlukla protein miktarını yansıtmaktan uzaktır. Bu nedenle cDNA çipleri ile yapılan mRNA analizi tabanlı çalışmalar, gün geçtikçe genetik ifade düzeyini ortaya koyan birer marker olarak algılanıp, hastalık ve hastanın durumuna ilişkin veriler için MS analizine başvurma stratejisi yerleşmektedir.

Protein – Protein Etkileşimleri:

MS'in en heyecan verici sonuçlar ortaya koyduğu alanlardan biri de Proteinler arası etkileşimlerin tespiti. Bu amaçla, antikolar ile çöktürülmüş ve pek çok protein içeren karmaşık yapıların analizinden, protein etkileşim ağlarının tespitine ve organellerin protein içeriklerinin tanımlanmasına kadar geniş bir alanda MS analizinden yararlanılmaktadır. Örneğin bir proteinin fosforilasyonu hangi proteinlerle ne gibi etkileşimler yaratmaktadır? Bu amaçla, yukarıda anlatıldığı gibi metabolik olarak işaretli, fakat bu sefer özdeş (yani farklılaşmış bir gen ifadesi veya protein degradasyon hızı beklenmeyen) ve farklı izotoplarla işaretli hücre hatlarından alınan özütler, daha önceden ilgilenilen proteinin biri fosforile diğeri ise fosforile olmayan formunun bulunduğu iki kolona uygulanır. Bu kolonlardan geri kazanılan proteinlerin MS analizleri kıyaslandığında hemen tamamen özdeş pikler gözlenir. Yalnızca ilgili proteinin fosforillenmesi ile etkileşme potansiyeli ciddi biçimde değişen protein(ler) farklı şiddette pikler vererek tanımlanırlar. Bu tanımlama kolaydır, çünkü kolonlardan kazanılan proteinler MS analizine birlikte verilmelerine rağmen örneğin fosforile proteinin bulunduğu kolona sadece ^{13}C 'li hücre özütü katılır. Böylece kolonlardan birine daha yüksek veya düşük bir ilgi ile bağlanan bir proteine ilişkin izotopik piklerin şiddetleri arasında bir fark olacaktır.

Proteinler arası etkileşimlerin tespiti, özellikle multiprotein kompleksleri tarafından gerçekleştirildiği bilinen hücresel etkinliklerin anlaşılmasında hayati bir öneme sahiptir. Ancak bu tip karmaşık yapıların izolasyonu ve analizi son derece zordur. Bu zorlukları giderebilmek için geliştirilen en son yaklaşımlardan biri de 'TAP etiketi' (TAP tag – Tandem Affinity Purification). Bu yöntemle az miktardaki hücreden, doğal yapısına uygun biçimde ve hızla protein kompleksi saflaştırması yapıla-

bilmektedir. TAP etiketi, içeriği bilinmeyen heteromerik kompleksler için aşırı ifade ettirmeye dayalı yöntemler (over expression) uygulanamayacağı ve hatta uygulansa bile farklı molar derişimler nedeniyle fizyolojik olarak aktif olmayan komplekslerin oluşmasına yol açabileceği gibi sorunların aşılması için geliştirilmiş farklı bir stratejidir. Temel olarak maya (*Saccharomyces cerevisiae*) için geliştirilmiş olan tekniğin farklı canlılara ait hücrelere de uygulanması mümkündür (aslına bakılırsa 'TAP etiketi' mayalarda kullanılan protein etkileşim analizi yöntemi 'yeast two hybrid system'in MS analizi için modifiye edilmiş bir türüdür). Bu yöntemde hedef proteine ilişkin dizi bir vektör üzerinde etiket görevi yapacak olan başka bazı proteinlere ait diziler ile birleştirilip konak hücrede kendi doğal ifade düzeyine uygun olarak üretilmesi sağlanır (bu amaçla yaygın olarak plazmit vektörler kullanılmaktadır). MS'in ~100fmol gibi çok düşük miktarlardaki proteinleri analiz edip tanımlayabilmesi nedeniyle bu iş çok düşük ifade düzeylerinde bile yapılabilir (femto- 10^{-15}). Yöntemin kilit noktası hibrit proteine eklenen etiketlerin niteliğinde yatar. Bunlar seçilen kolon materyaline kuvvetle bağlanacak ancak hedef proteinin özgül etkileşim biçimlerine mümkün olan en alt düzeyde etkide bulunacak olan proteinlerden seçilir. Etiket iki bölümden oluşur ve 'tandem' ifadesinin de belirttiği gibi ardı ardına iki affinite kolonu saflaştırması yapılır. Bunun için ilk kolona bağlanan materyaller, bağlanmayanlar yıkandıktan sonra, etiketin kolona tutunan kısmına yakın bir bölgesinden daha önceden tasarlanmış özgül bir dizisine etkileyen bir enzim aracılığıyla hücresel koşullarda kesilerek alınır. Bu işlem esnasında koşullarla oynama gerektirmeyen bir enzim kesiminin kullanılması, kompleksin dağılmasını veya alakasız proteinlerle yeni etkileşimler kurmasını engeller. Etiketinin ikinci kolona tutunan kısmı ise, ilk kolondan kazanım esnasında gelen bulaşmalar ve kesimde kullanılan enzimin yıkanmasının ardından, kendine özgü her hangi bir yöntemle kolondan ayrıştırılıp kompleks bileşenleri izole edilebilir. Bu şekilde yapılan analiz için tasarlanan farklı etiketler vardır. Bunların her birinin kolona bağlanma, geri kazanım ve hedef proteinin etkileşimlerini etkileme düzeyleri açısından farklılıkları vardır. Bu nedenle tekrarlanan ve hata oranları test edilen deneyler ile çok daha kesin sonuçlara ulaşmak mümkün olabilmektedir. Bu tekniğin kullanılmasıyla, mRNA işlemede görev alan ve kaynak canlı olan mayanın tüm genom analizi uzunca bir zaman önce bitmiş olmasına rağmen tespit edilememiş olup insan dâhil ileri organizasyonlu canlılarda homologları bulunan yeni bir snRNP bulunmuştur. Bu, maya U1 snRNP'nin bir alt birimi olan ve Snu30p/YDL087C diye adlandırılan bir proteindir. Yöntemin işleyişi için şekil.37 ve ayrıntılı protokolleri ile son gelişmeler için de <http://www.emblheidelberg.de/ExternalInfo/seraphi>

n/TAP.html adresli internet sitesi incelenebilir. Şekil.37'de A'dan E'ye kadar basamaklarda sırasıyla vektörlerin tasarımı, TAP etiketinin amino asit kompozisyonu, farklı TAP etiketleri, etiketin ifade sonrası kompleks oluşturma ve ardışık kolon saflaştırması basamakları şematize edilmiştir.

Bir diğer etkileşim analizi, pek çok alt birimden oluşan proteinlerin incelenmesidir. MS analizi burada da büyük vaatler sunmaktadır. Moleküllerin 3boyutlu yapısından tutun da çaplarına ve hatta alt birimlerinin birbirleri arasında kurduğu ilişkilerin niteliğine kadar pek çok bilgiyi MS analizi ile edinmek mümkündür (Şekil.38 ve 39).

Proteinler arası etkileşimler genellikle doğrudan doğruya birliktelik kurulması yoluyla olmaz. Pek çok protein bir ağ içerisinde karşılıklı etkileşimler göstererek çalışır. Bu tip etkinliklerin tespiti ve analizi için öncelikle ağı oluşturan proteinlerin tanımlanması gerekir. Bu amaçla MS analizine başvurmak akılcı bir çözümdür. Örneğin organellerin içeriklerinin belirlenmesi MS analizinin önemli uygulamalarındandır. Fakat bu konudaki temel problem, pek çok organelin sadece kendisinin içerdiği proteinlerle izole edilmesinin çok da mümkün olmayışdır. Ancak yapılan çalışmalar göstermiştir ki, bulaşma yoluyla gelen proteinler MS analizinde değişken bir profil sergilerken, organelle has proteinler daha sabit bir düzey sergilemektedirler. Böylece çekirdekçik gibi organellerin bile tanımlanmaları başarıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil.40). Konu hakkında ayrıntılara "Çekirdekçik Protein Veritabanı" ("*Nucleolar Protein Database*") isimli internet sitesinin aşağıdaki adresinden ulaşılabilir

<http://www.dundee.ac.uk/lifesciences/lamonddatabase/>.

Gelecek ve İnsanın Rolü:

P-MS'in kullanım alanları geniştir. Bu nedenle gelecekte bugünden de çok kullanılacak bir teknik olduğuna şüphe yok. Örneğin ilginç bir çalışmada MS parmak izi analizinden, bir ekosistem çalışmasında yararlanılmıştır (*A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles*. Waltraud X. Schulze, Gerd Gleixner, Klaus Kaiser, Georg Guggenberger, Matthias Mann, Ernst-Detlef Schulze. *Oecologia* (2005) 142: 335–343). Bu çalışmada göl toprağındaki proteinlerin %88'inin ve iğne yapraklı orman toprağındaki proteinlerin ise %50'den azının bakteriyel kökenli olduğu tespit edilmiştir. Böylece makro boyutta epeyce bilinen karbon döngüsünün, kaynağı olan reaksiyonların incelenmesi ile mikro boyutta da aydınlatılmasının önü açılmıştır.

Bu tip uç uygulamaları bir tarafa bırakırsak, özellikle sağlık alanındaki uygulamalar hızla artmaktadır. MALDI gibi bir dakikadan az zamanda uygulanabilen teknikler bu alanda ciddi olanaklar sunmaktadır. Yine de pek çok araştırmacı 2D-PAGE uygulamasından kaçınmak için MALDI-MS analizine sıcak bakmamaktadır. Özellikle jeller üzerindeki spotların enzimatik olarak işlenmesi ve MALDI-MS analizine yönlendirilmesi zor bir iştir (Şekil.46). Dahası, bu zorluğa rağmen deneyin tekrar edilebilirliği ve sadece belirli bir protein üzerinde uygulamanın yarattığı seçici avantajlar bazı durumlarda MALDI-MS uygulamasını zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla karmaşık protein karışımları için HPLC analizini off-line olarak MS analizine yönlendirme yoluna gidilmiştir. Bu iş, ayrıştırılmış örneklerin LC çıkışında metal plakalar üzerine tespit edilip daha sonra MALDI tekniği ile MS analizine yönlendirilmesi yoluyla yapılır. Off-line birleştirme, teknik olarak zor olsa da tekrarlayan deneylere ve istenilen her örnek üzerinde ayrıntılı analizlerin yapılabilmesine olanak vermektedir.

Bir diğer tıbbi uygulama ise "*SELDI – yüzey artırılmış lazer iyonizasyonu (surface enhanced laser desorption/ionization)*" aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Ayrıca kan gibi bir vücut sıvısının ion-exchange veya hidrofobisite gibi bir özelliği olan bir yüzeye yerleştirilmesi ve MALDI analizine yönlendirilmesi ile elde edilen protein ve peptit paternlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ile pek çok hastalığı ve safhasını belirleyen standart değerlerin tespiti, umut vaat eden bir çalışma alanıdır.

Veri tabanı karşılaştırma yazılımları da gelişmekte olan bir alandır. Ancak pek çok uzmanın fikir birliğinde olduğu konu ileride de bugün olduğu gibi gelişmiş yazılımlarla beraber yetişmiş uzmanların da her zaman önemli olacağıdır. Ancak zaman içinde insana düşen iş yükünün azalacağı öngörülmektedir.

Referanslar (yalnızca genel içerikli yayınlar):

1.) "THE ABC'S (AND XYZ'S) OF PEPTIDE SEQUENCING" Hanno Steen and Matthias Mann, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, Vol.: 5, September 2004.

2.) Nature Insight "Proteomics", *Nature*, Vol 422, 13 March 2003 (6 yayın):

"193, From genomics to proteomics", *M. Tyers & M. Mann*

"198, Mass spectrometry-based proteomics", *R. Aebersold & M. Mann*

"208, Protein analysis on a proteomic scale", *E. Phizicky, P. I. H. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder & S. Fields*

"216, From words to literature in structural proteomics", A. Sali, R. Glaeser, T. Earnest & W. Baumeister

"226, Disease proteomics", S. Hanash

"233, Biomedical informatics for proteomics", M. S. Boguski & M. W. McIntosh

3.) "What does it mean to identify a protein in proteomics?", Juri Rappsilber and Matthias Mann, TRENDS in Biochemical Sciences Vol.27 No.2 February 2002

4.) "Tandem mass spectrometric analysis of complex biological mixtures", Fred W. McLafferty, International Journal of Mass Spectrometry 212 (2001) 81–87

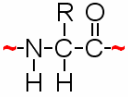
5.) "Applications of Protein Mass Spectrometry in Cell Biology", Adele Rowley, Jyoti S. Choudhary, Martina Marzioch, Malcolm A. Ward, Malcolm Weir, Roberto C. E. Solari, and Walter P. Blackstock, METHODS 20, 383-397 (2000)

6.) "A surfeit of '-omics'", Walter Blackstock, (Editorial), DDT: TARGETS Vol. 3, No. 4 August 2004 (drug discovery today)

7.) "Identifying proteins and post-translational modifications by mass spectrometry", Bernhard Ktister and Matthias Mann, Current Opinion in Structural Biology 1998, 8: 393-400

8.) "Rapid 'de Novo' Peptide Sequencing by a Combination of Nanoelectrospray, Isotopic Labeling and a Quadrupole/Time-of-flight Mass Spectrometer", Andrej Shevchenko, Igor Chernushevich, Werner Ens, Kenneth G. Standing, Bruce Thomson, Matthias Wilm and Matthias Mann, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 11, 1015–1024 (1997)

NOT: Alt başlıklarla ilgili konuların referans yayınlarına ders sorumlusundan ulaşılabilir.

Tablo 1		şeklindeki yapının kütlesi
Amino asit ve kodu		
Glisin/Gly/G	57,021464 / 57,05	
Alanin/Ala/A	71,037114 / 71,08	
Serin/Ser/S	87,032029 / 87,08	
Prolin/Pro/P	97,052764 / 97,12	
Valin/Val/V	99,068414 / 99,07	
Treonin/Thr/T	101,04768 / 101,1	
Sistein/Cys/C	103,00919 / 103,1	
Lösin/Leu/L	113,08406 / 113,2	
İzolösin/Ile/I	113,08406 / 113,2	
Asparajin/Asn/N	114,04293 / 114,1	
Aspartat/Asp/D	115,02694 / 115,1	
Glutamin/Gln/Q	128,05858 / 128,1	
Lizin/Lys/K	128,09496 / 128,2	
Glutamat/Glu/E	129,04259 / 129,1	
Metiyonin/Met/M	131,04048 / 131,2	
Histidin/His/H	137,05891 / 137,1	
Fenilalanin/Phe/F	147,06841 / 147,2	
Arjinin/Arg/R	156,10111 / 156,2	
Tirozin/Tyr/Y	163,06333 / 163,2	
Triptofan/Trp/W	186,07931 / 186,2	

Hazırlayan:

Şafak MERT
"Genomik ve Proteomik" dersi ödevi (ders sorumlusu: Dr. Hatice BALKAN MERGEN)
11 Ekim 2005

Tablo 3: Bazı yaygın ve önemli post-traslasyonel modifikasyonlar

PTM türü	Δ Kütle ^a (Da)	Kararlılık ^b	İşlev
Fosforilasyon			
pTyr	+80	+++	Enzim aktivitesinin ve moleküler etkileşimlerin kontrolü, haberleşme
pSer, pThr	+80	+ / ++	
Asetilasyon	+42	+++	Protein kararlılığı, N terminalinin kapatılması, protein DNA etkileşimlerinin düzenlenmesi (histonlar)
Metilasyon	+14	+++	Gen ifadesinin düzenlenmesi
Açılasyon, yağ asidi modifikasyonu			
Farnesyl	+204	+++	Hedeflenmiş sinyallerin hücresel konumlandırılması, membran yapısının oluşumu, protein etkileşimleri için aracılık
Myristoyl	+210	+++	
Palmitoyl	+238	+ / ++	
Glikozilasyon			
N-bağlı	>800	+ / ++	Proteinlerin salgılanması, hücre-hücre haberleşmesi ve algılaması, O-GlcNAc için geri dönüşlü düzenleyici
O-bağlı	203, >800	+ / ++	
GPI çapası	>1.000	++	Glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası. Enzim ve reseptörlerin membrana sabitlenmesi, özellikle plazma membranının dış kısmı için
Hidroksiprolin	+16	+++	Protein kararlılığı ve protein-ligand etkileşimleri
Sulfolama (sTyr)	+80	+	Protein-protein ve reseptör-ligand etkileşimleri
Disülfid bağı oluşumu	-2	++	Molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar, protein kararlılığı
Deaminasyon	+1	+++	Protein-protein ve protein-ligand etkileşimleri için muhtemel regülatör, yaygın bir artifact
Piroglutamik asit	-17	+++	Protein kararlılığı, N terminalinin kapatılması
Ubiquitinasyon	>1.000	+ / ++	İmha sinyali. Tripsin muamelesinden sonra, ubiquitinasyon bölgesi Gly-Gly dipeptidi ile modifiye olur.
Tirozin nitrasyonu	+45	+ / ++	İnflamasyonda oksidatif tahrip

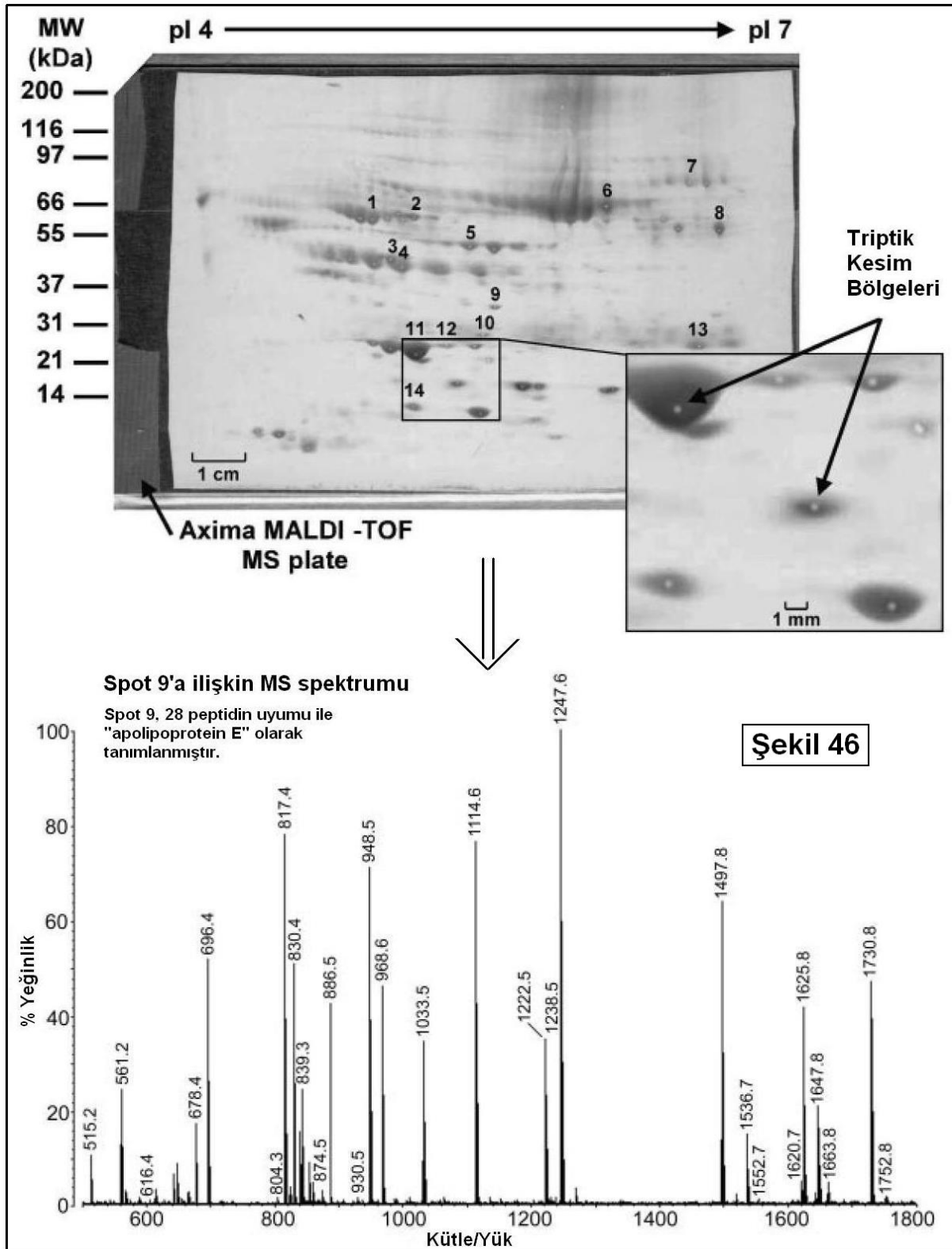
a. Daha geniş kapsamlı bir PTM Δ kütle değerleri tablosu için

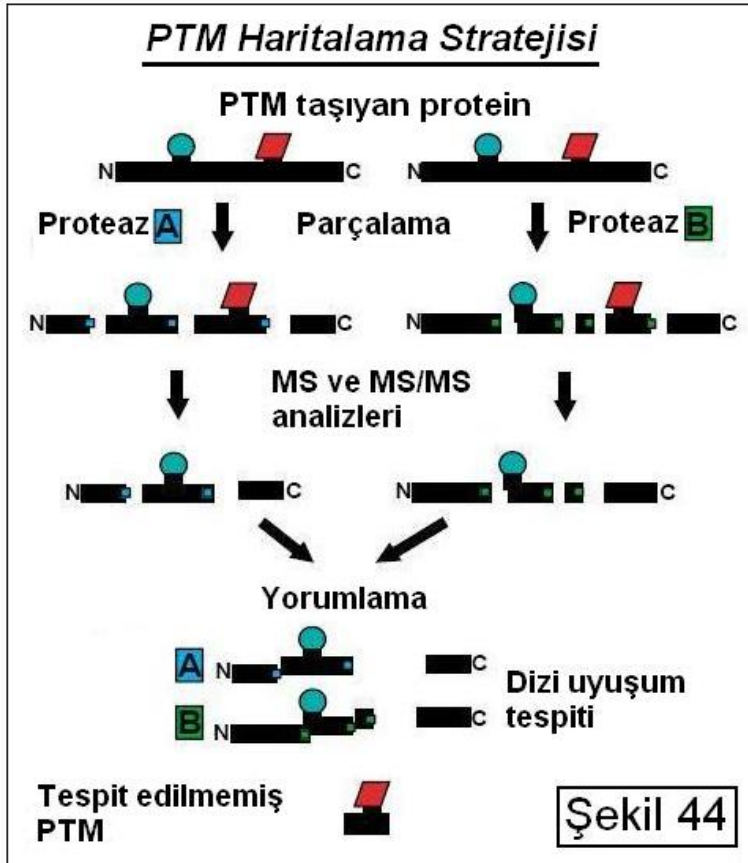
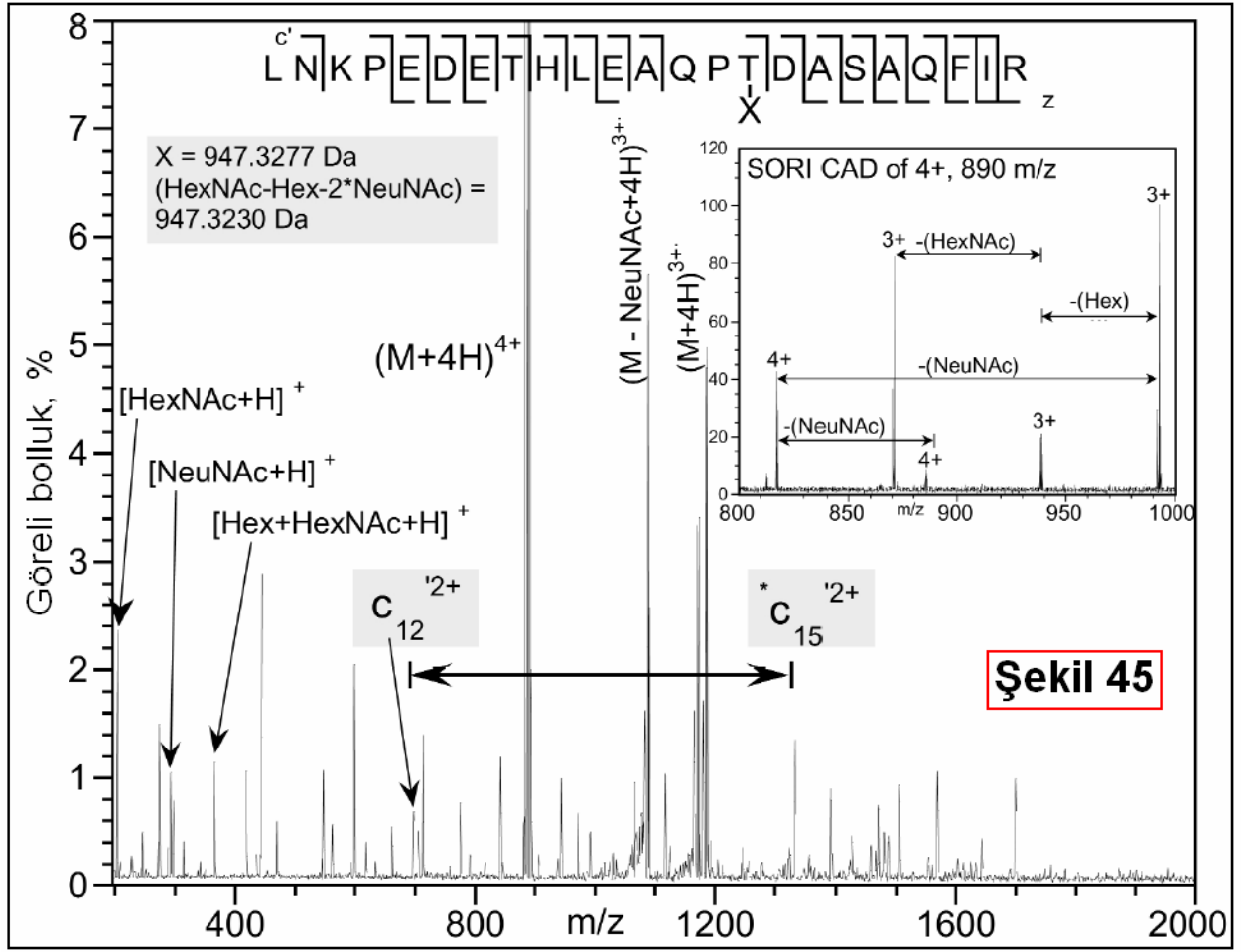
<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home> adresine başvurulabilir.

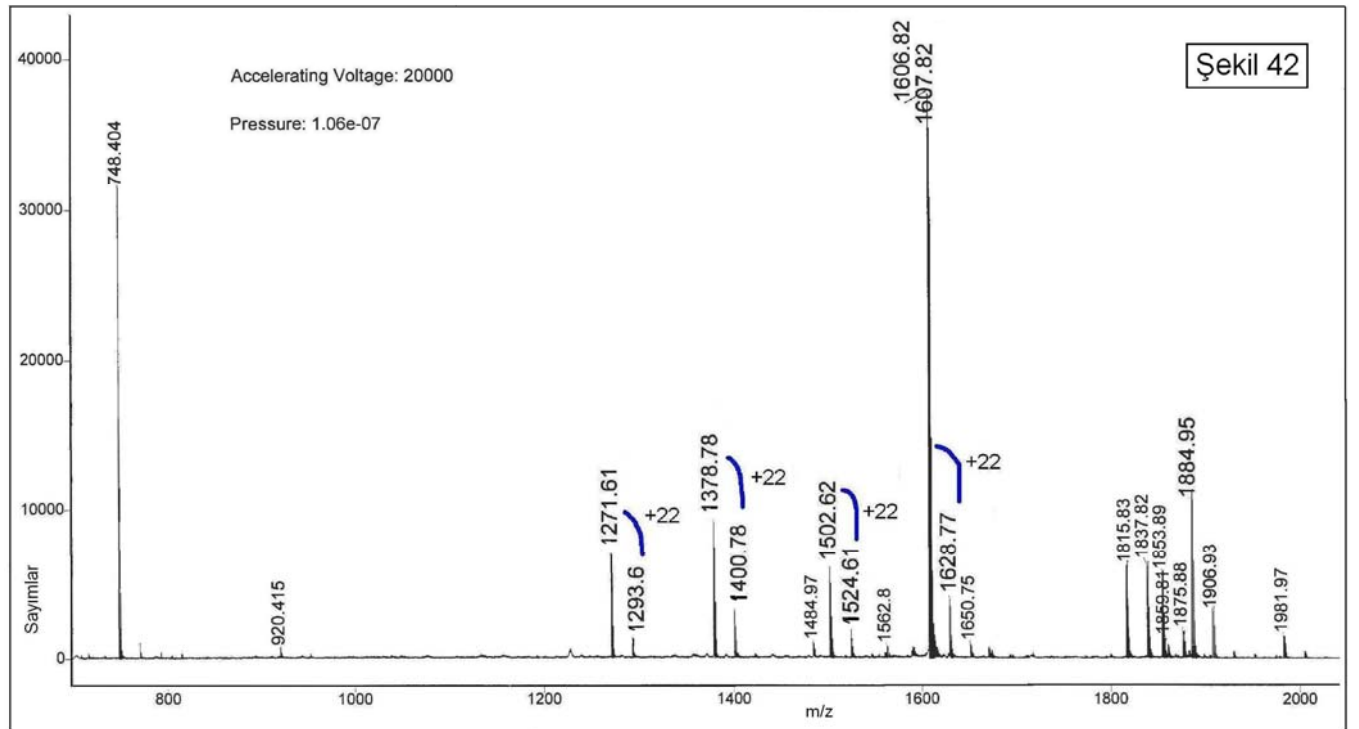
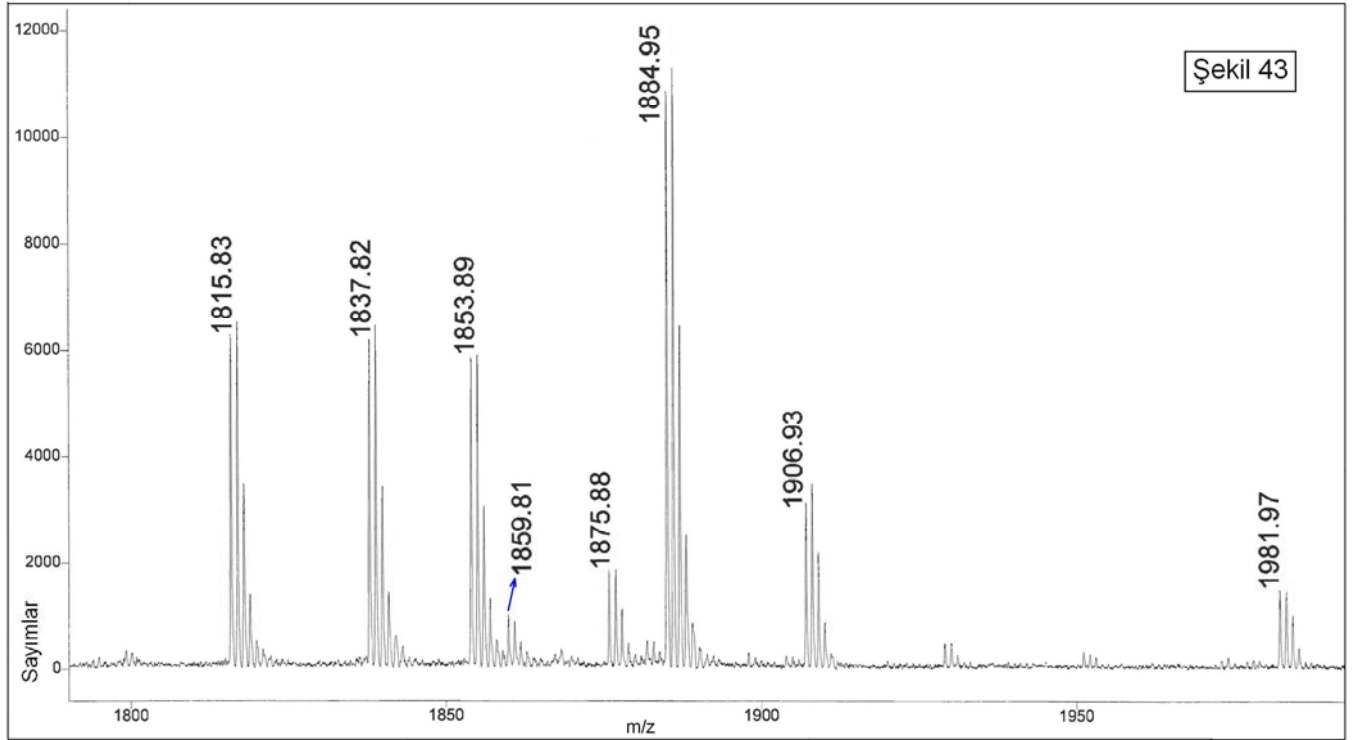
b. Kararlılık: + tandem MS'de kırılğan, ++ görece kararlı, +++ kararlı

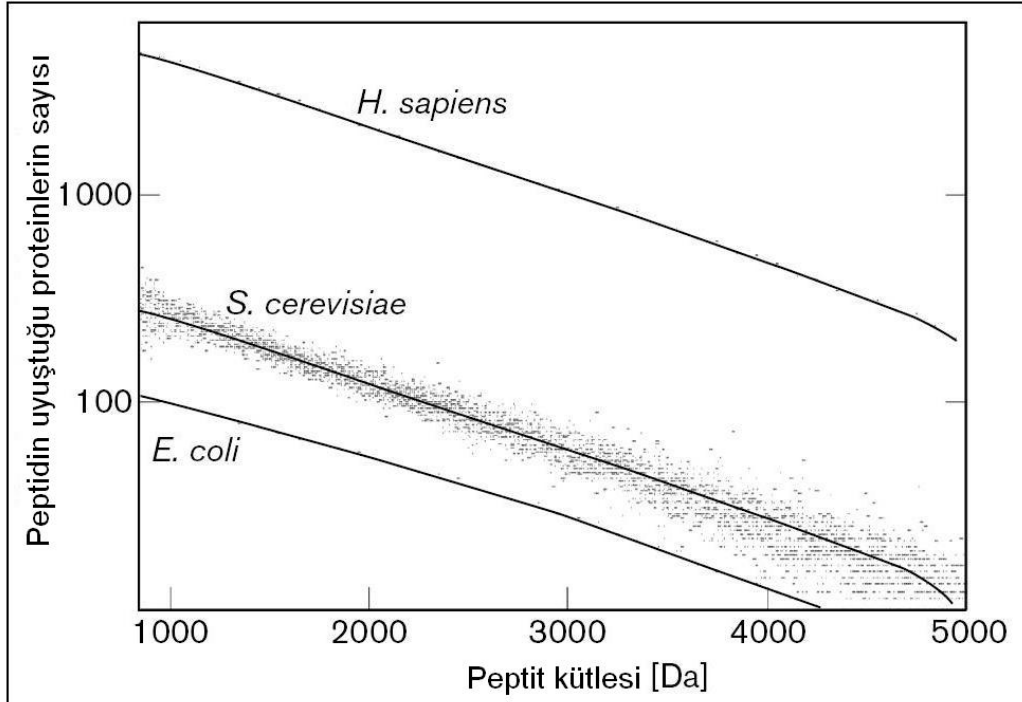
Matriks	Peptit/Protein	Karbonhidrat	Nükleik asit
HCCA (4-hydroxy-a-cyanocinnamic acid)	+++		
Sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid)	+++		
DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid)	+++	+++	
THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone)	++		+++
3-hydroxy-picolinic acid			+++
Ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)	+		++
*337 nm veya 355 nm UV Lazeri ile kullanılırlar			

Tablo 2





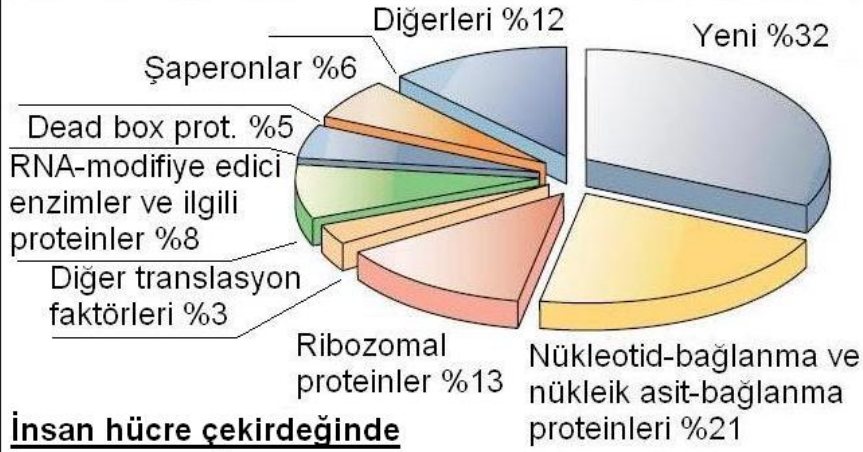
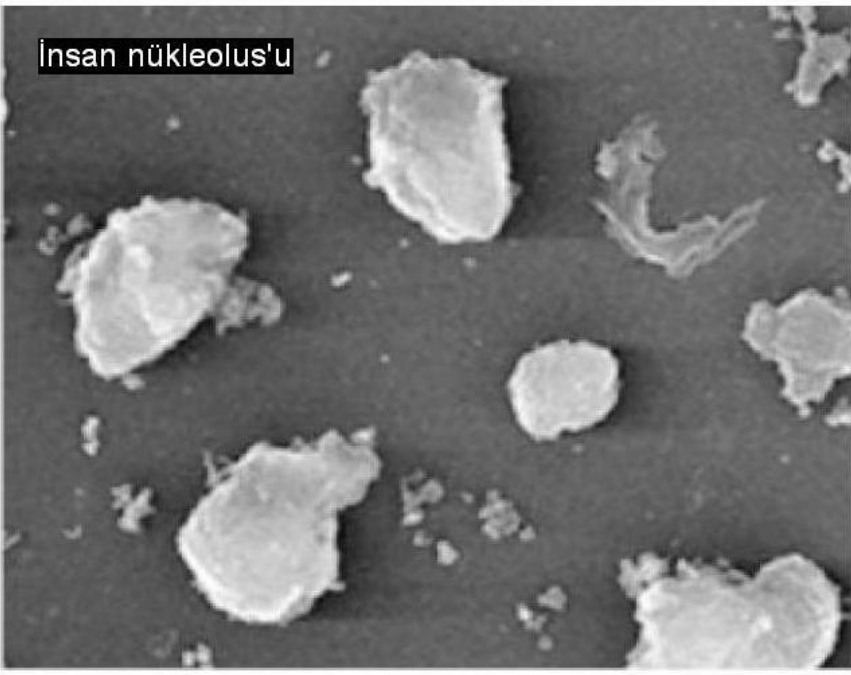




Tek bir triptik peptidin enformasyon içeriği, canlıdan canlıya değişir. Daha çok açık okuma çerçevesine (ORF) sahip türler için doğaldır ki, her bir peptidin farklı proteinlerle uyuşma sayısı artar. Üç örnek tür için çizilen yukarıdaki grafikte maya'ya ilişkin veriler gerçek uyuşma sayısını gösteren noktalar halinde ifade edilmiş, diğer türler için ise basitleştirilmiş bir çizgi ile belirtilmiştir. *Escherichia coli* için ~4000 ORF, *Homo sapiens* için ~100.000 ORF ve *Saccharomyces cerevisiae* için ~6000 ORF değerleri kullanılmıştır. Doğaldır ki insan için kullanılan bu sayı gerçek sayıdan çok fazladır.

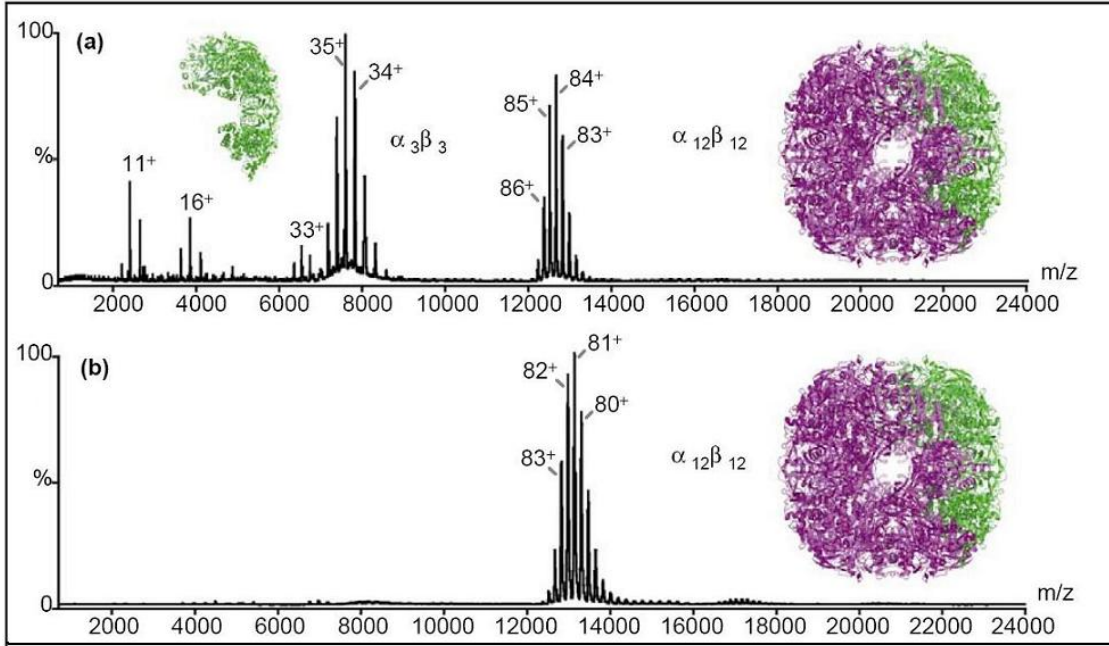
Şekil 41

İnsan nükleolus'u



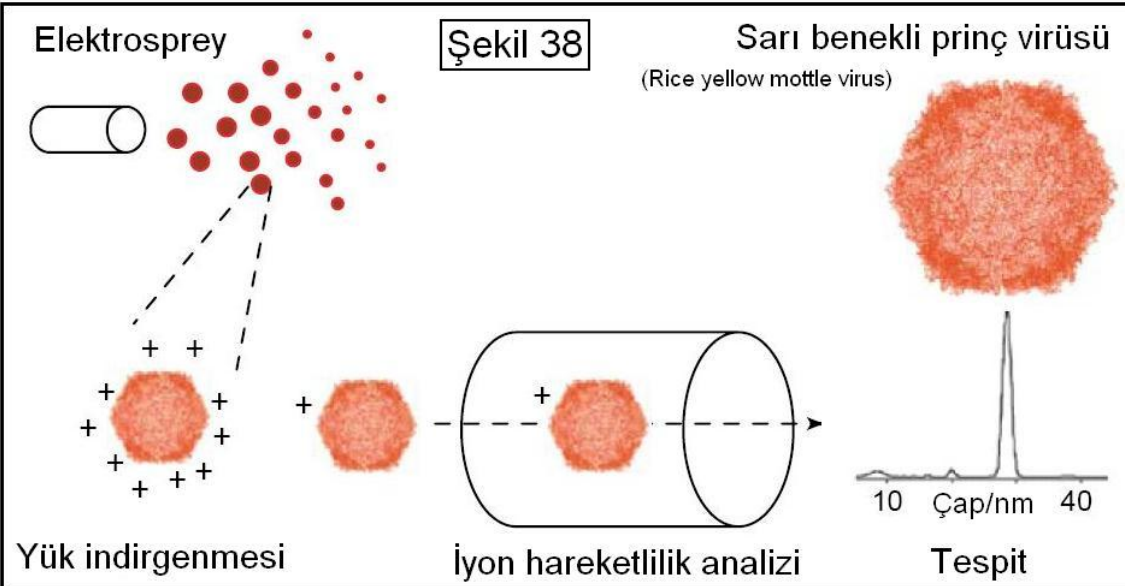
İnsan hücre çekirdeğinde bulunan 400'ü aşkın proteinin işlevsel dağılımı

Şekil 40

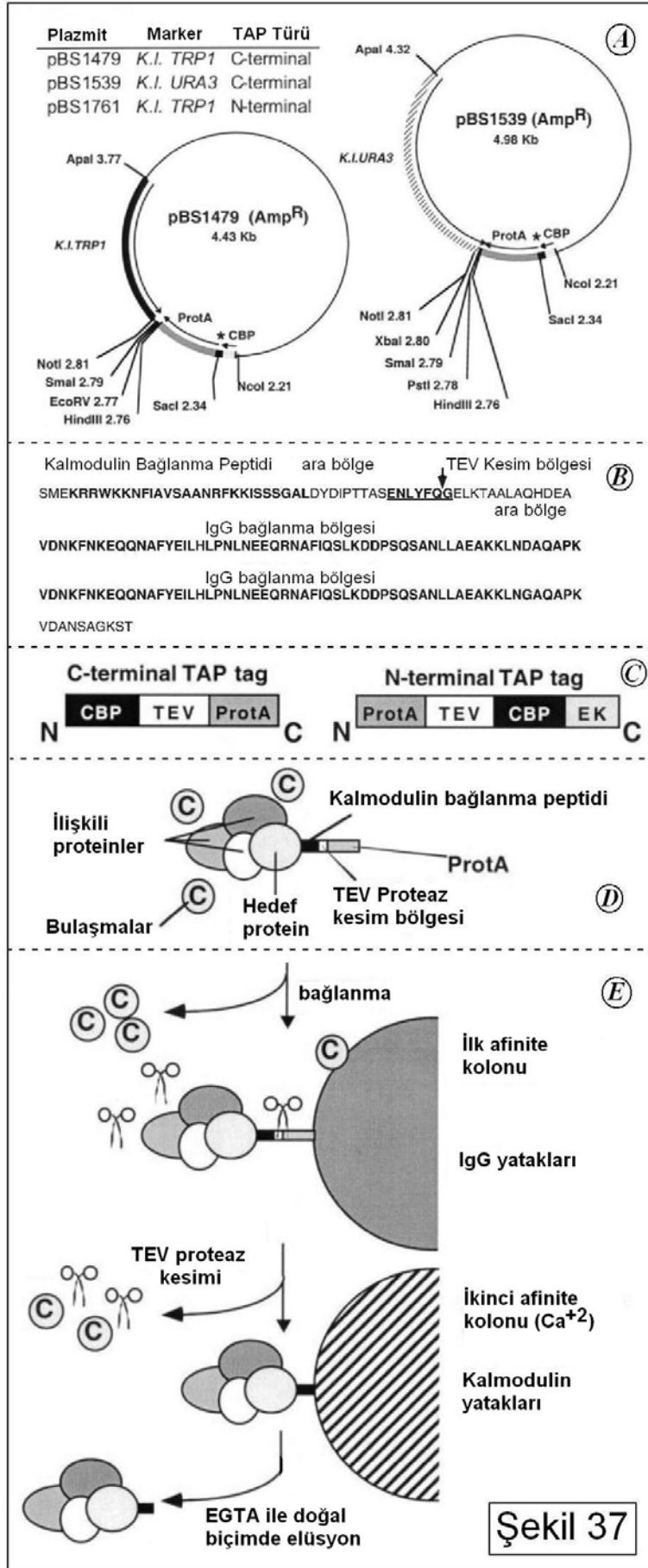


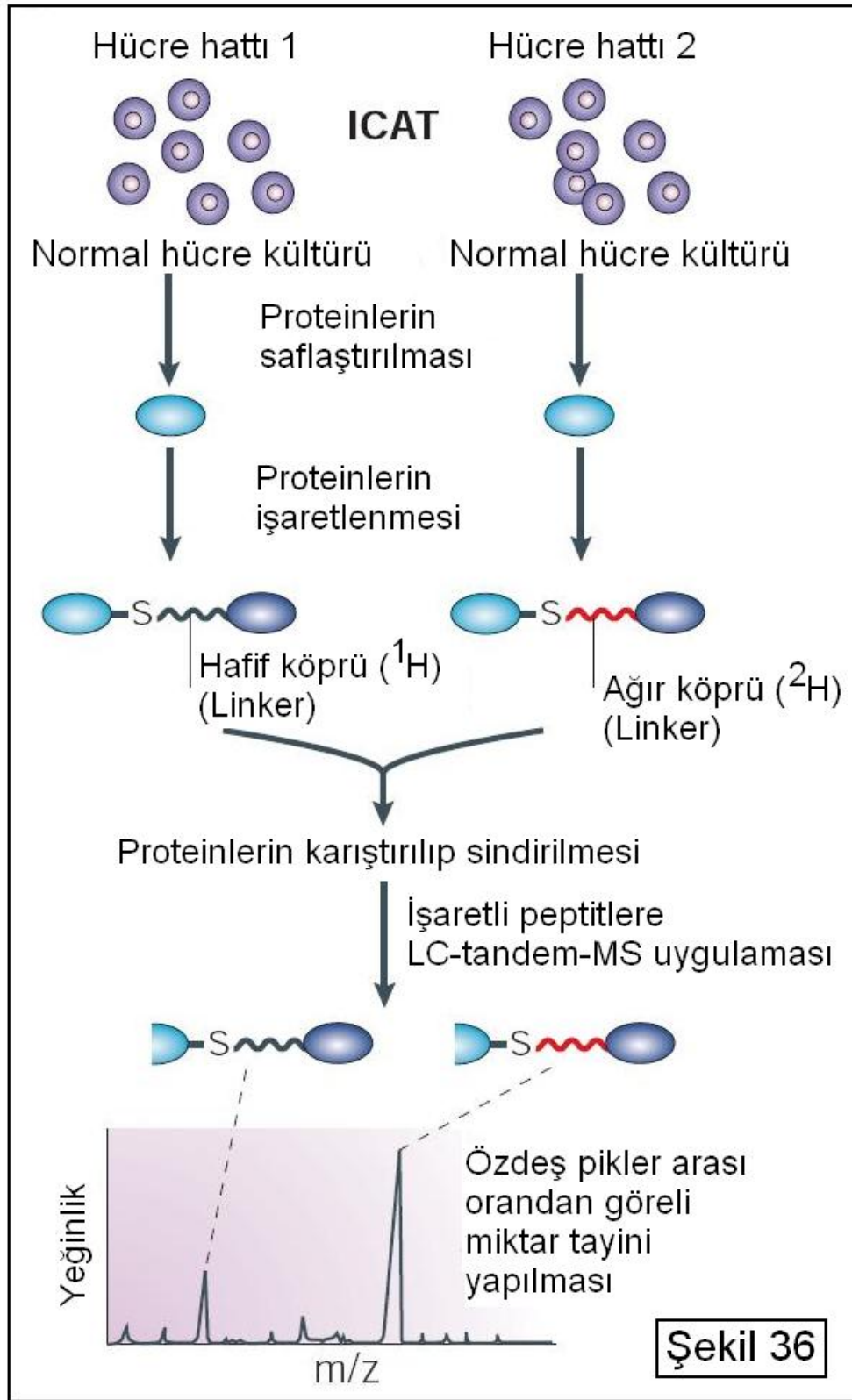
H. pylori çağımızın en yaygın patojenlerinden biridir. Yukarıdaki grafiklerde farklı koşullar altında yapılan MS analizleri ile etkinliğinin önemli kaynaklarından biri olan *H. pylori* üreazının alt birimlerinin birleşim yapısı hakkında ayrıntılı bilgi elde edilmiştir. pH 6.7'de 200mM asetat çözeltisi içinde gerçekleştirilen ilk deney oda sıcaklığında yapılmış ve (a) grafiği elde edilmiştir. İkinci deney ise +4 C'de gerçekleştirilmiş ve (b) grafiği elde edilmiştir. Bu sayede görülmüştür ki, $\alpha_{12}\beta_{12}$ şeklinde 24 alt birimden oluşan 1MDa'dan ağır enzim, aslından daha sıkı bağlı $\alpha_3\beta_3$ şeklindeki yapıların oluşturduğu bir tetramer biçiminde bir davranış sergilemektedir.

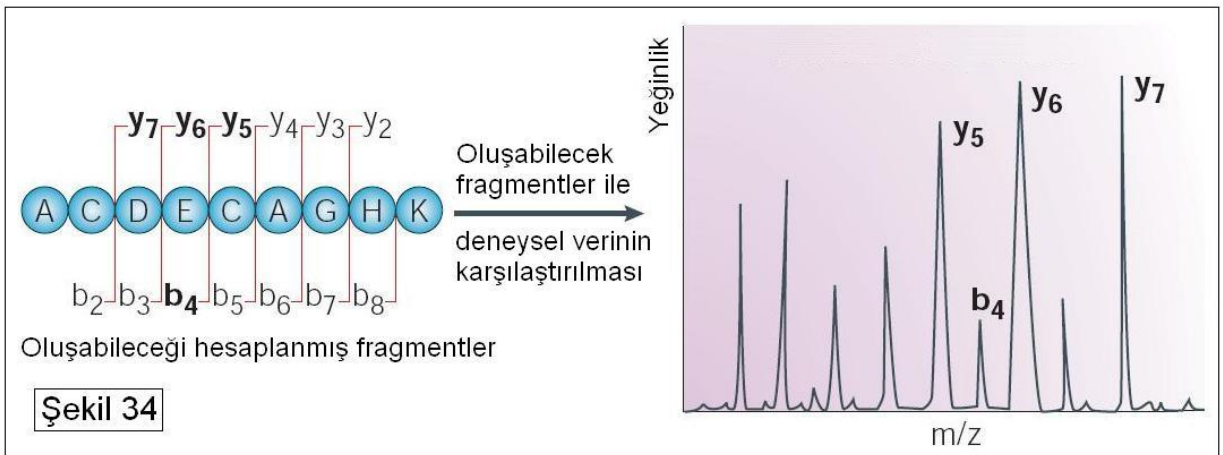
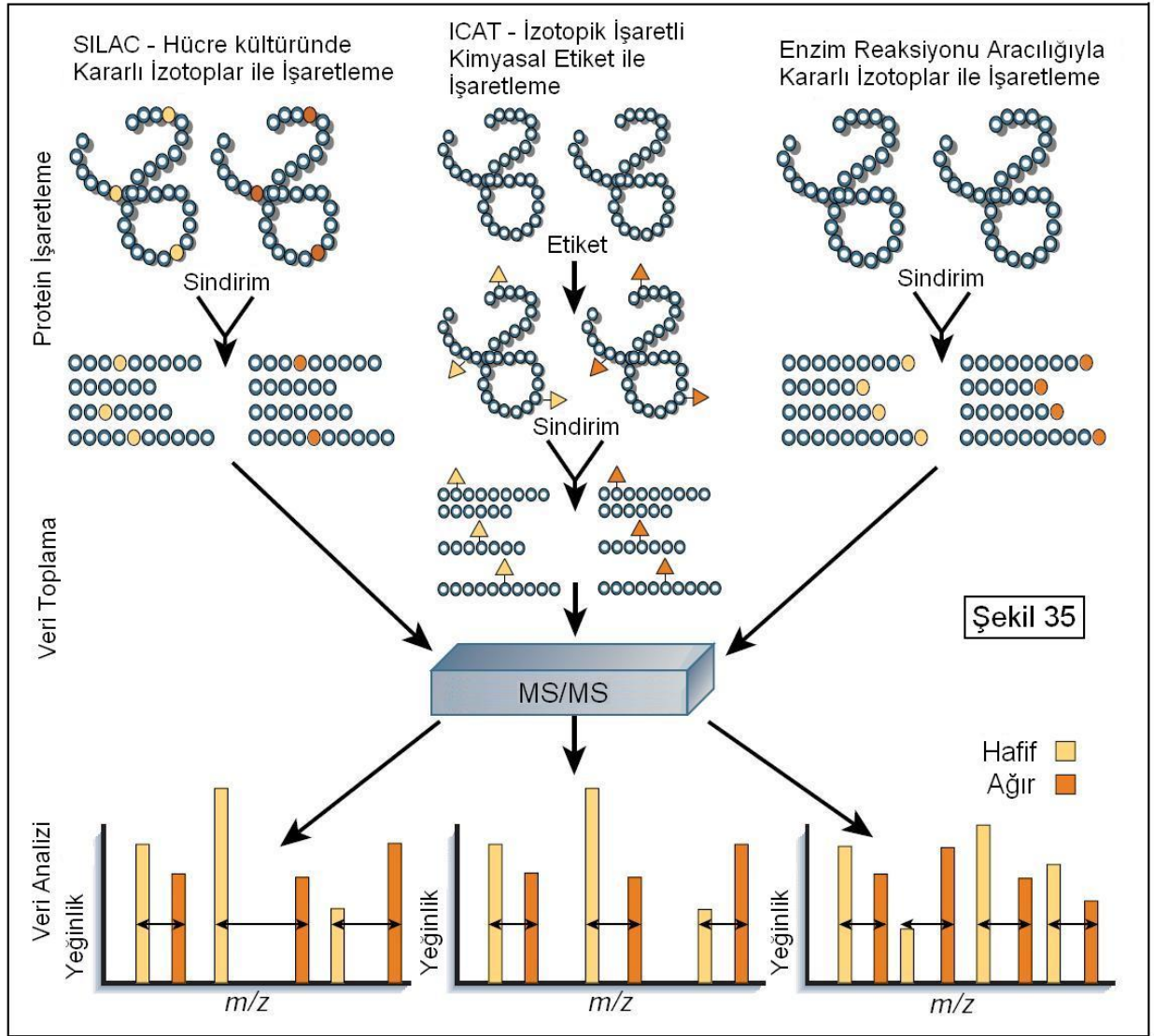
Şekil 39

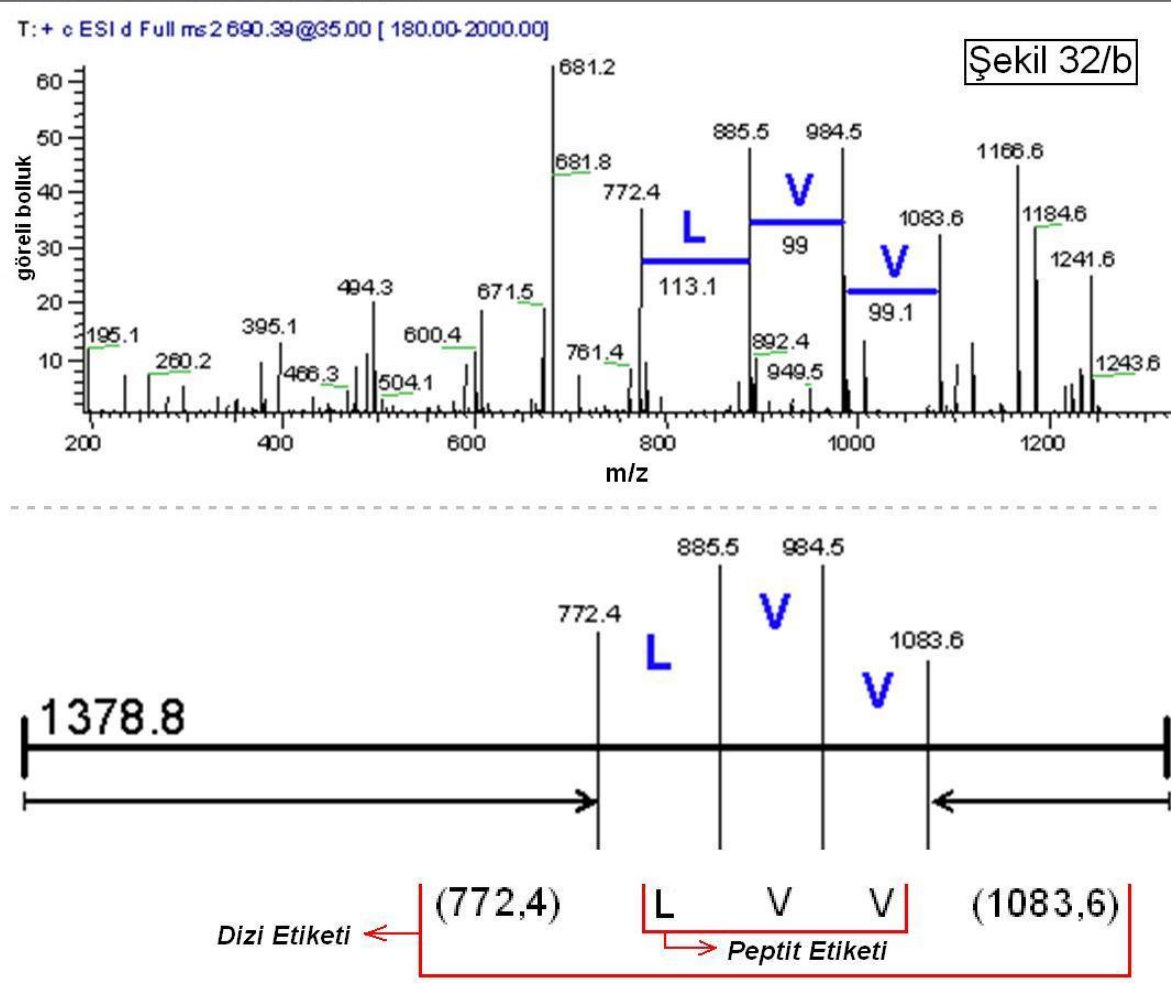
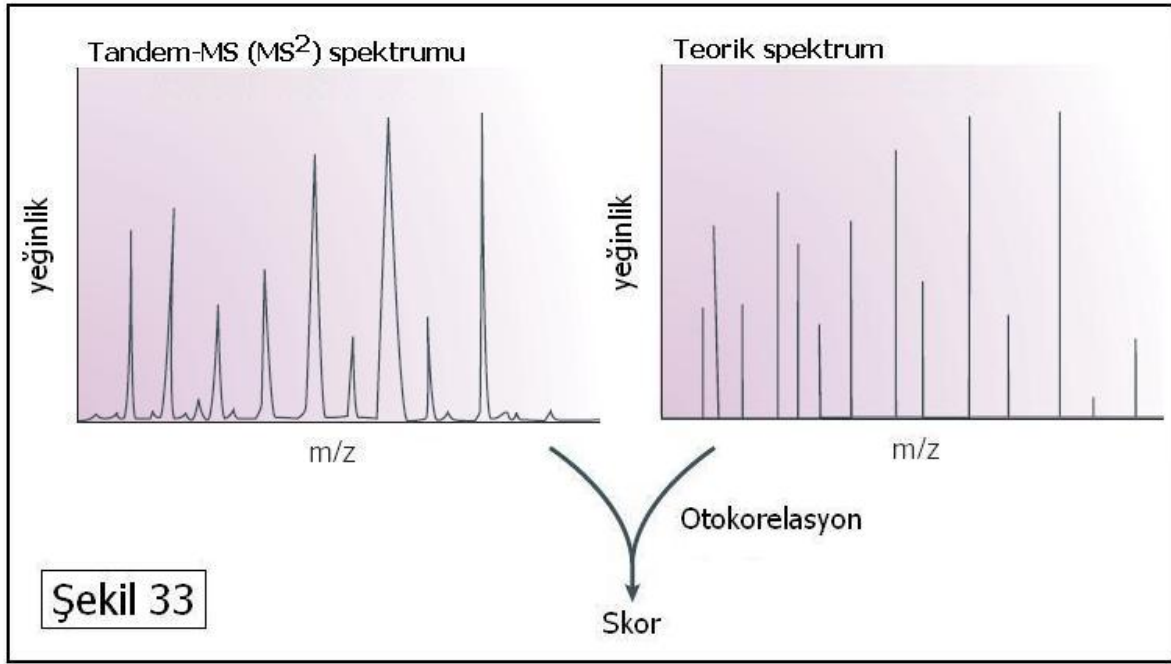


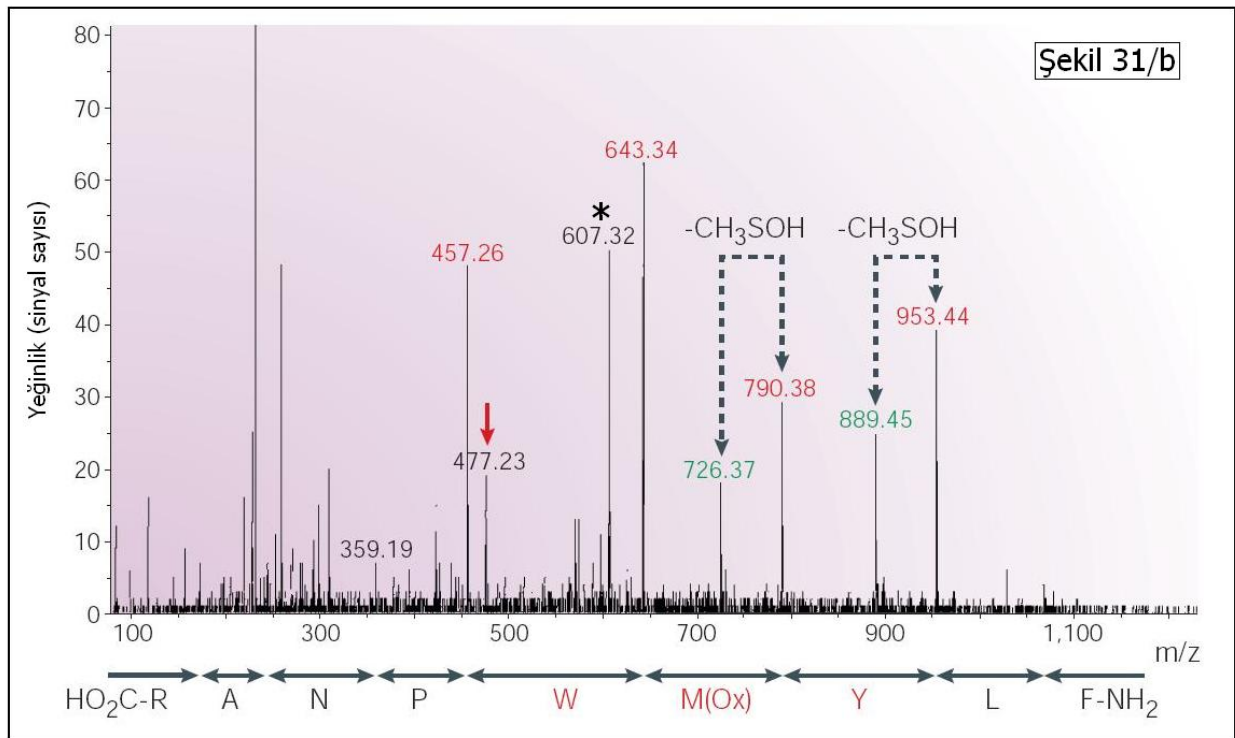
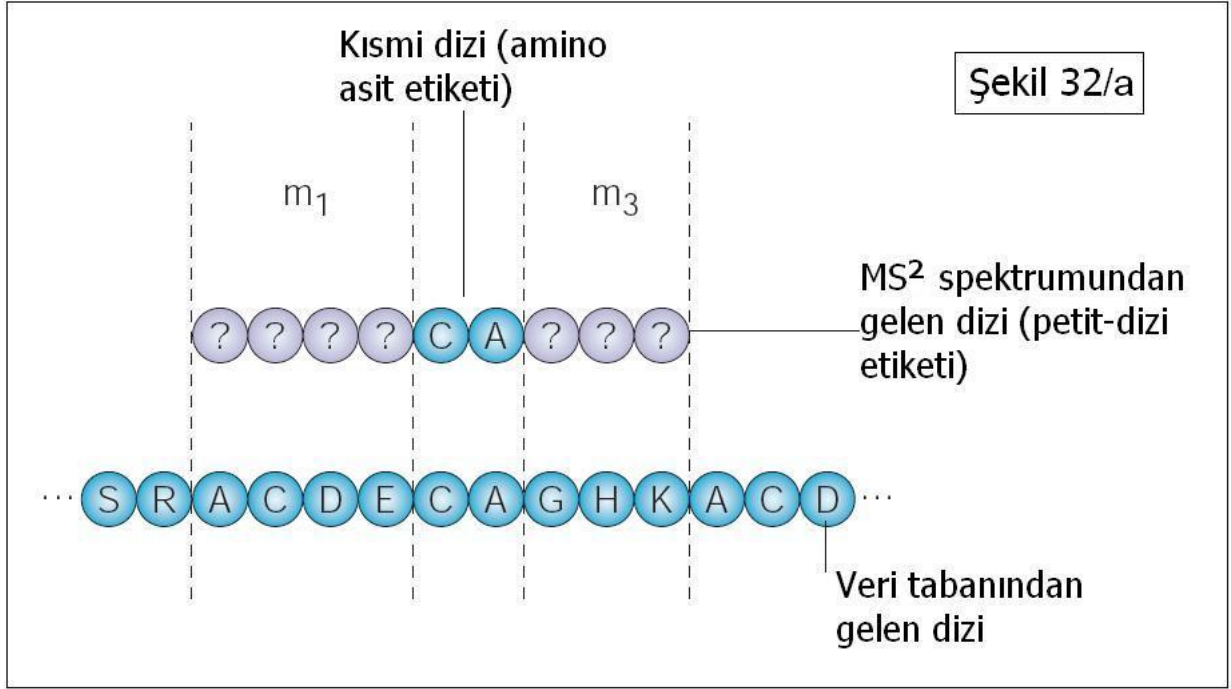
Elektrosprey kaynağının ürettiği iyonların atmosferik koşullar altında hareketliliklerinin incelenmesi ile dördüncül yapıları ortaya konulur. Hava sürtünmesinin yarattığı bu etkinin incelenmesi molekülün yüzey alanı ve dolayısıyla çapı hakkında bilgi verir.



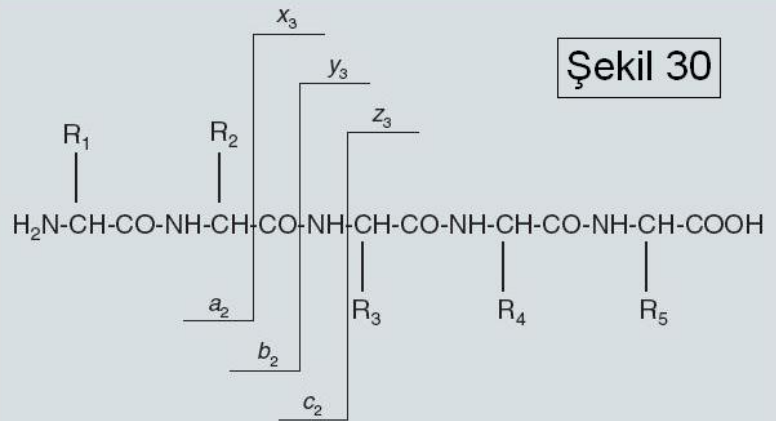
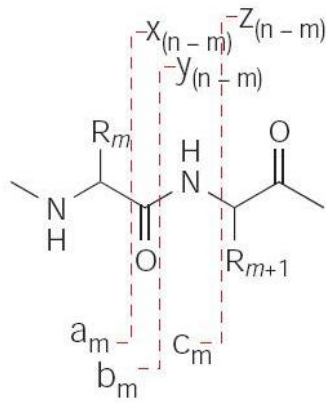
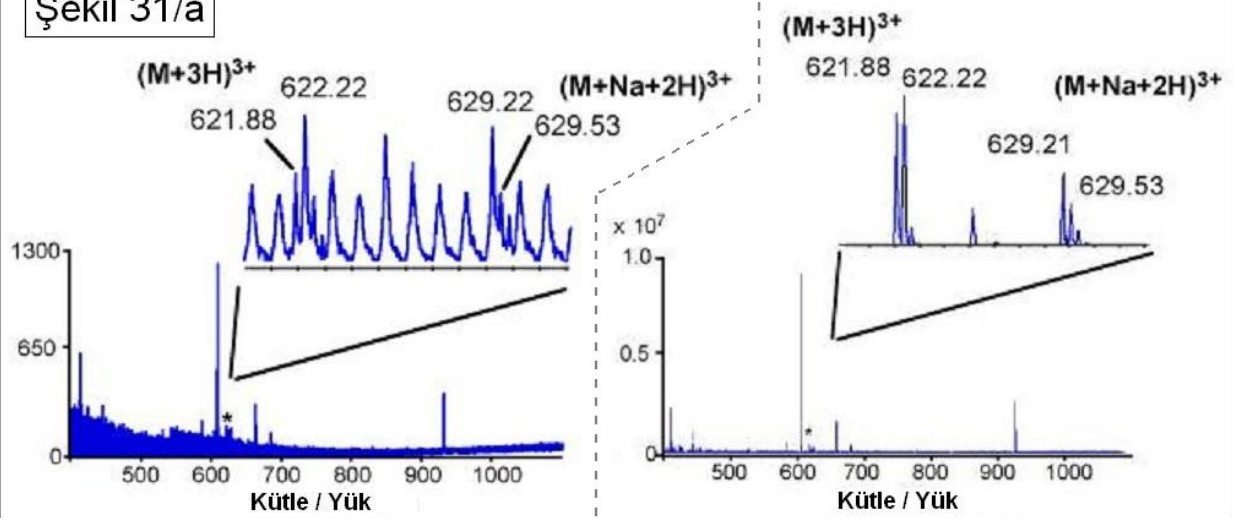




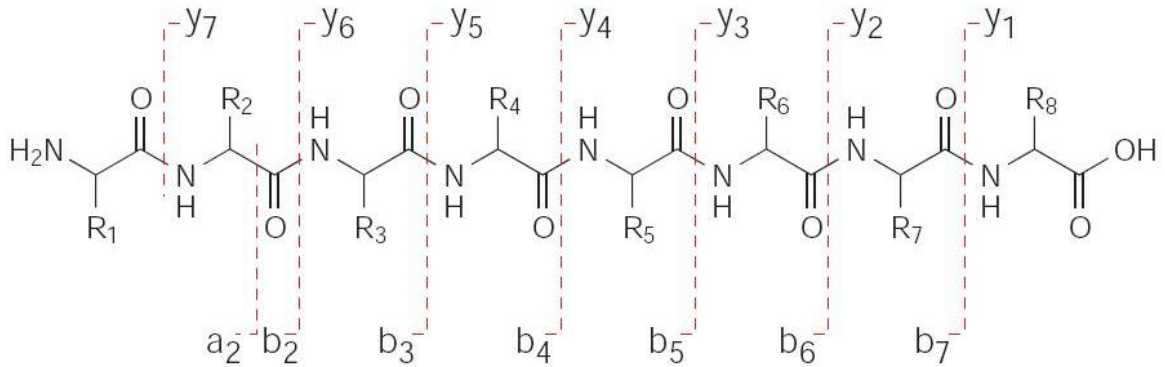


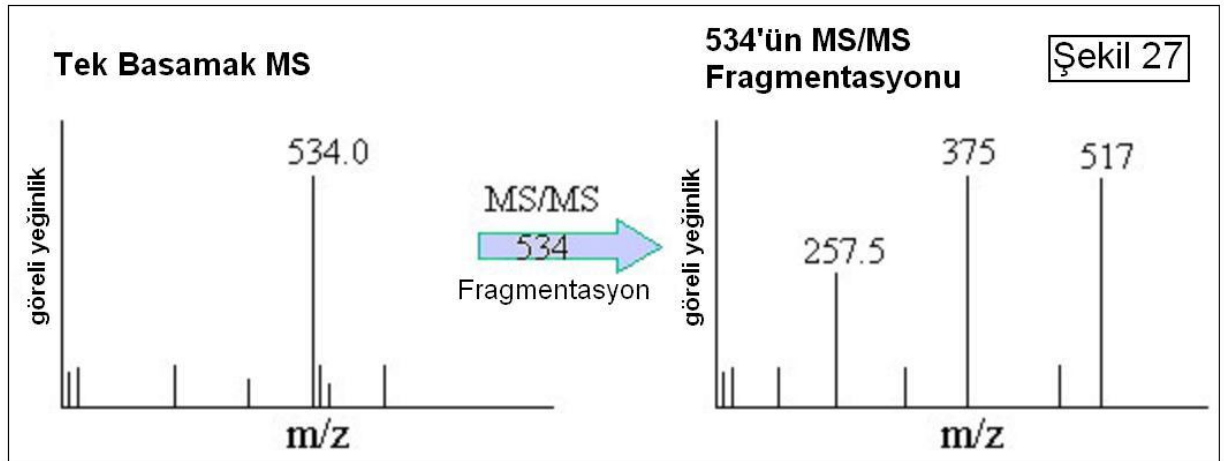
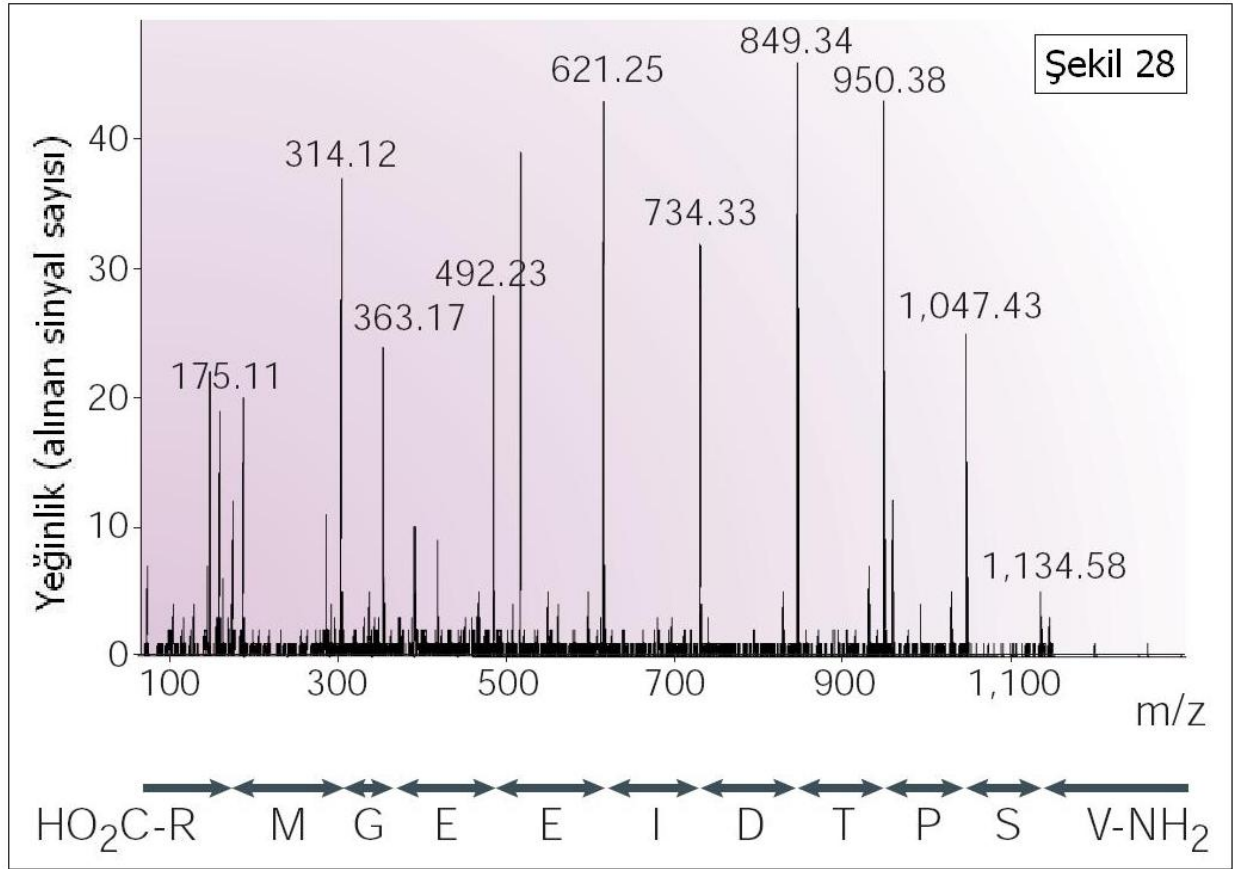
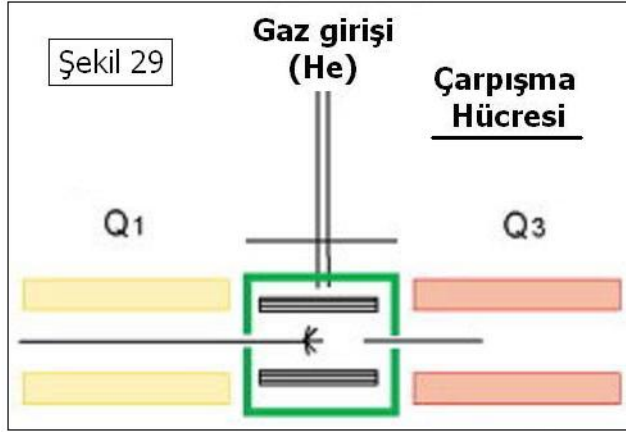


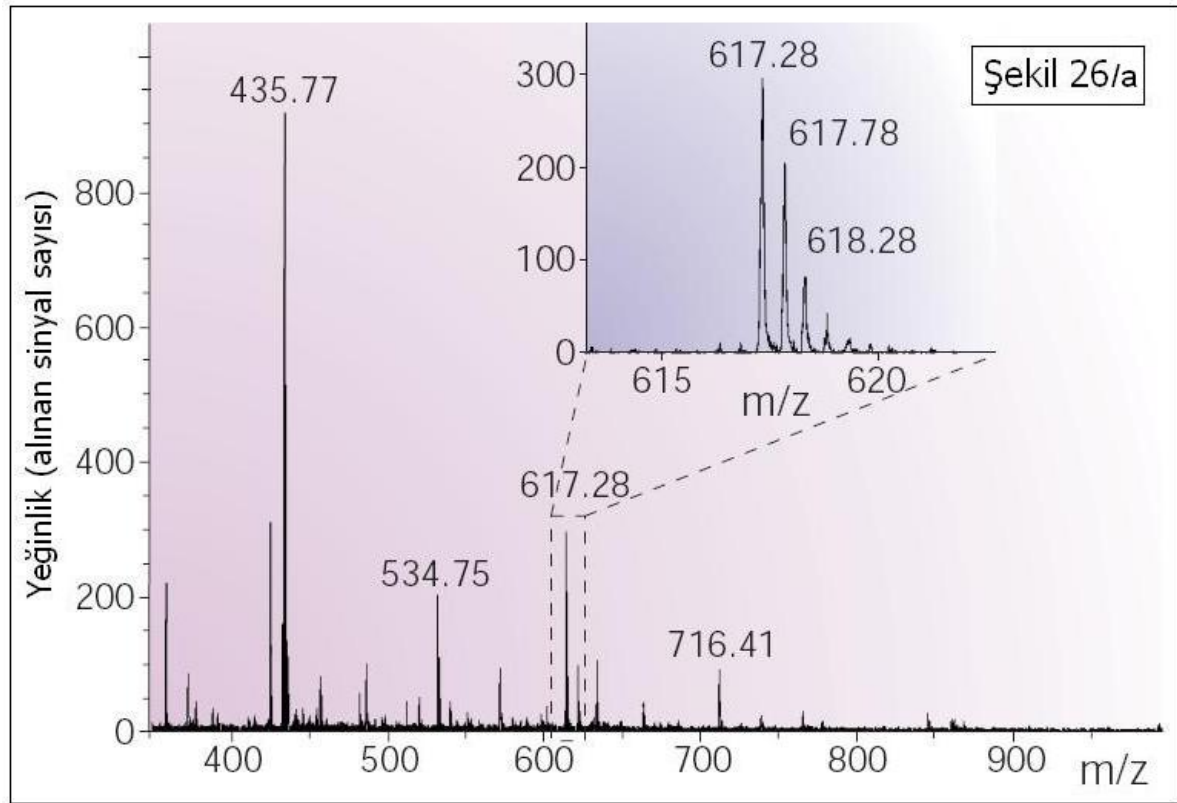
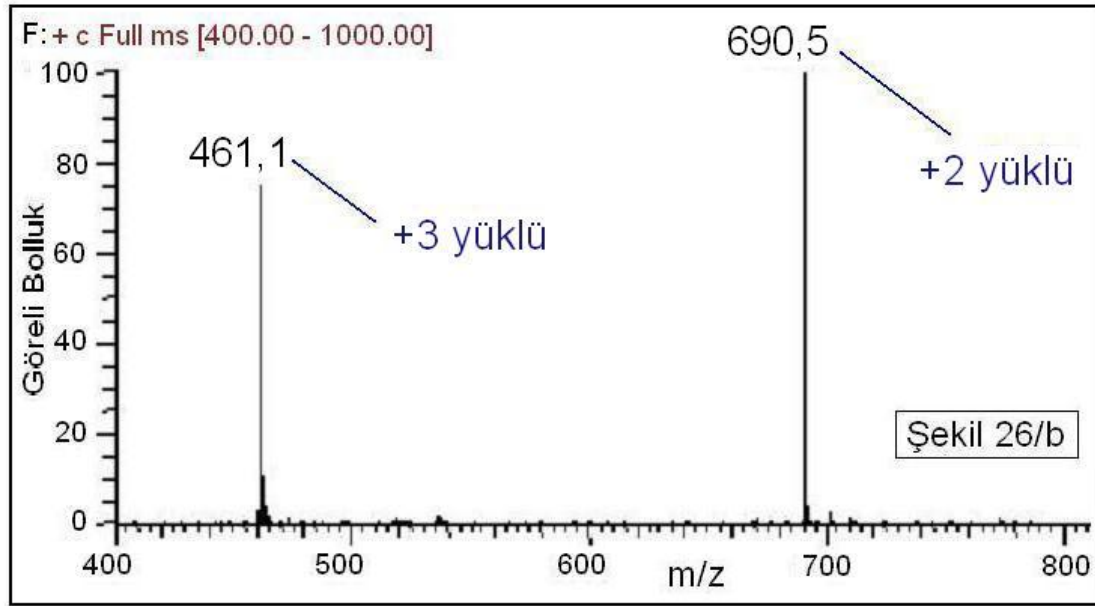
Şekil 31/a

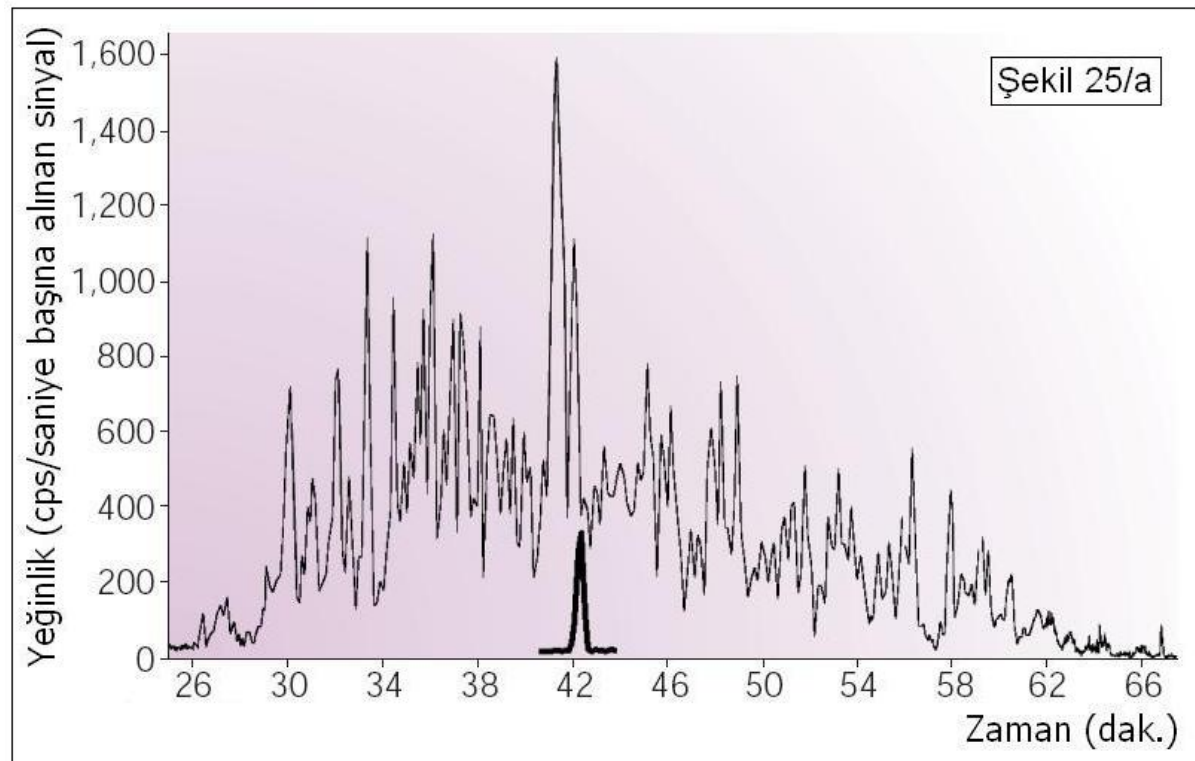
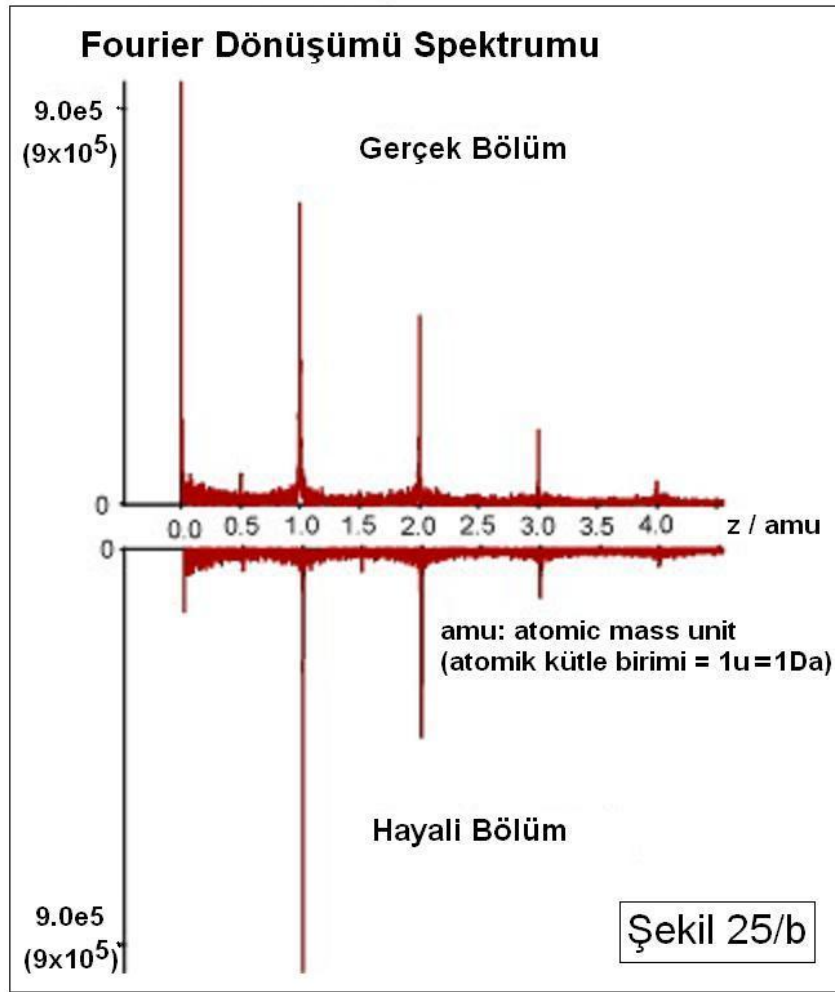


Şekil 30

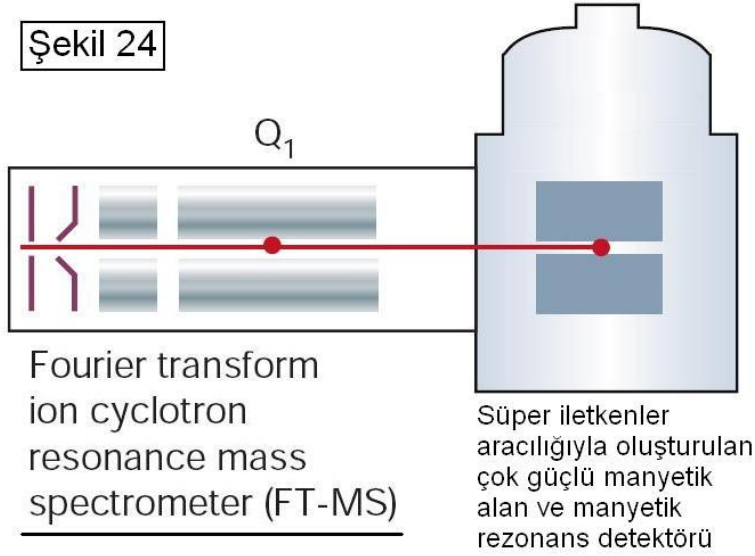






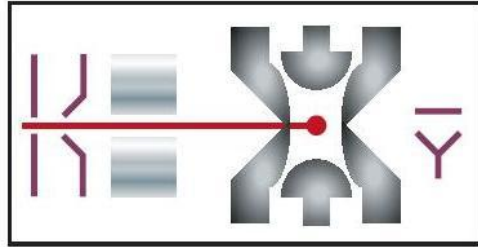


Şekil 24

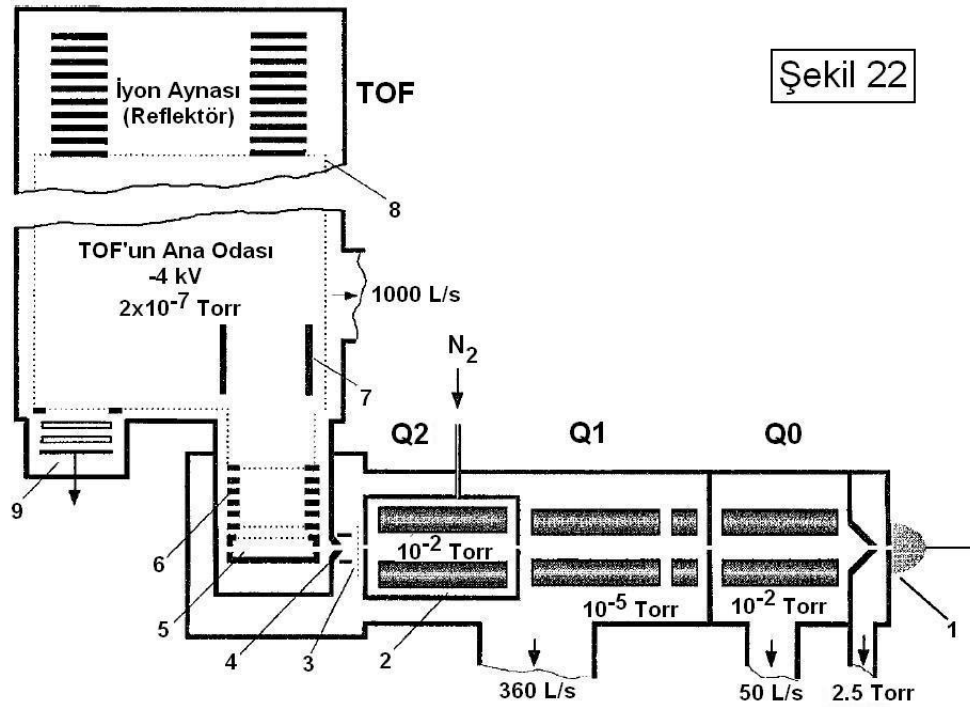


İyon kapanı

Şekil 23

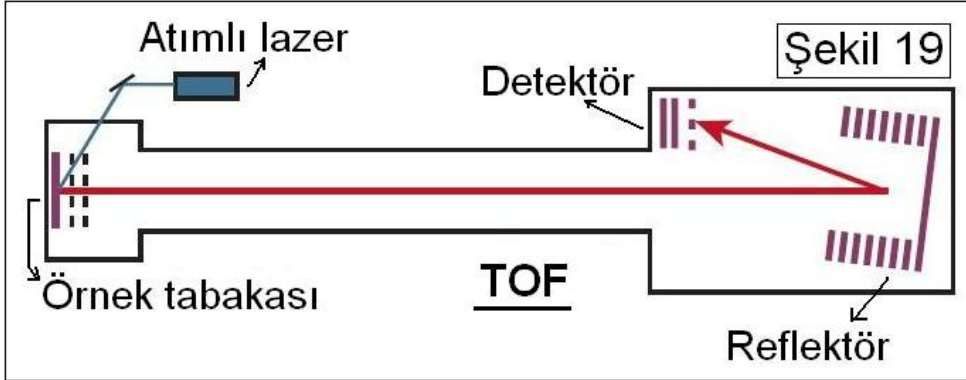
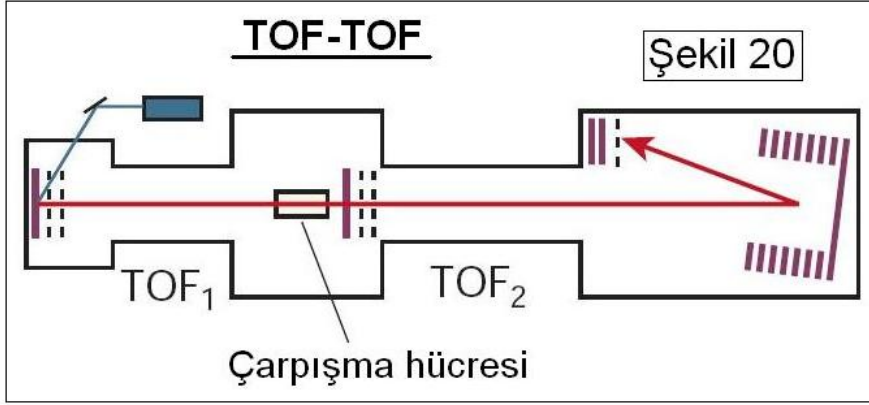
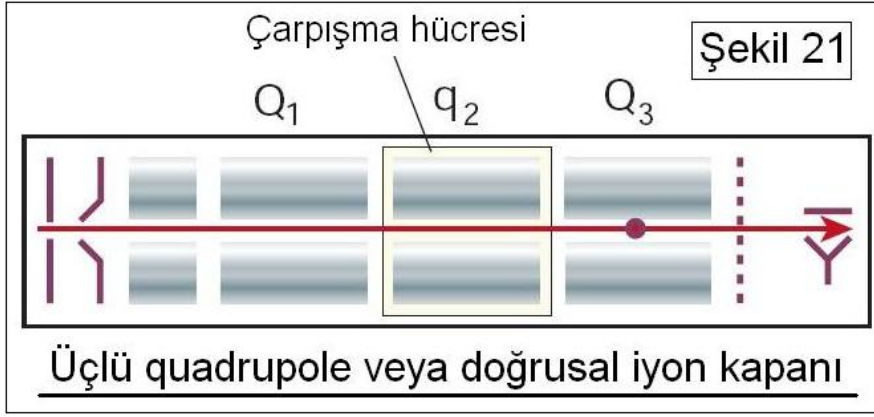


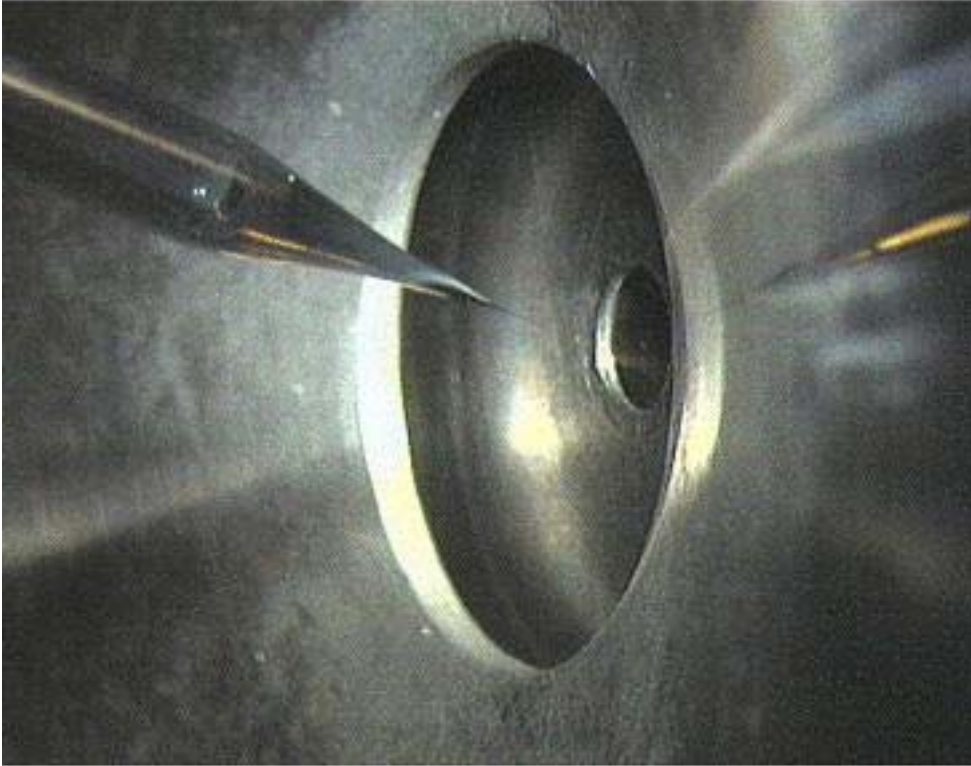
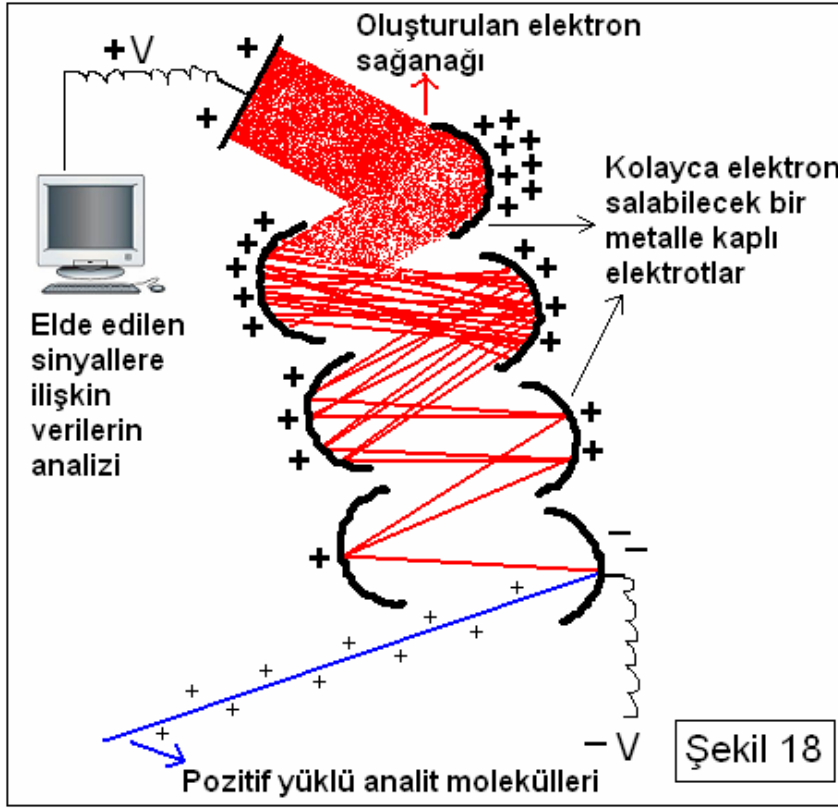
Şekil 22



Quadrupole-TOF türü bir kütle spektrometresinin şematik gösterimi (QqTOF)

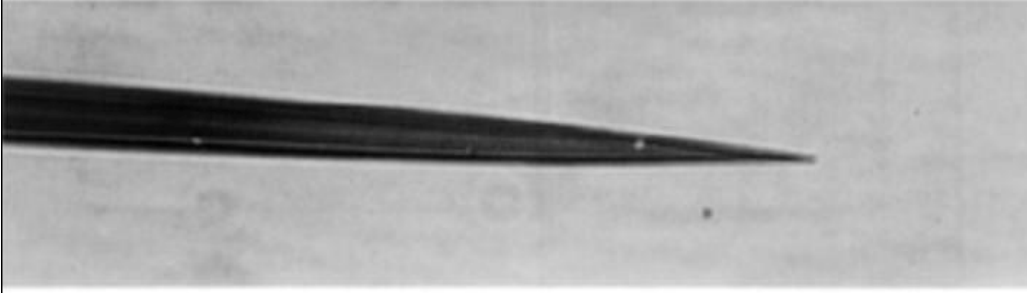
- 1.-elektrosprey kaynağı, 2.-çarpışma hücresi, 3.-odaklama ızgarası ve DC-quadrupole
- 4.-yarık 2X8mm, 5.-iyon depolama modülatörü, 6.-ivmelendirici kolon, 7.-sapırcı plakalar,
- 8.-doğrusal bölge (uçuş bölgesi), 9.-detektör.





Şekil 17

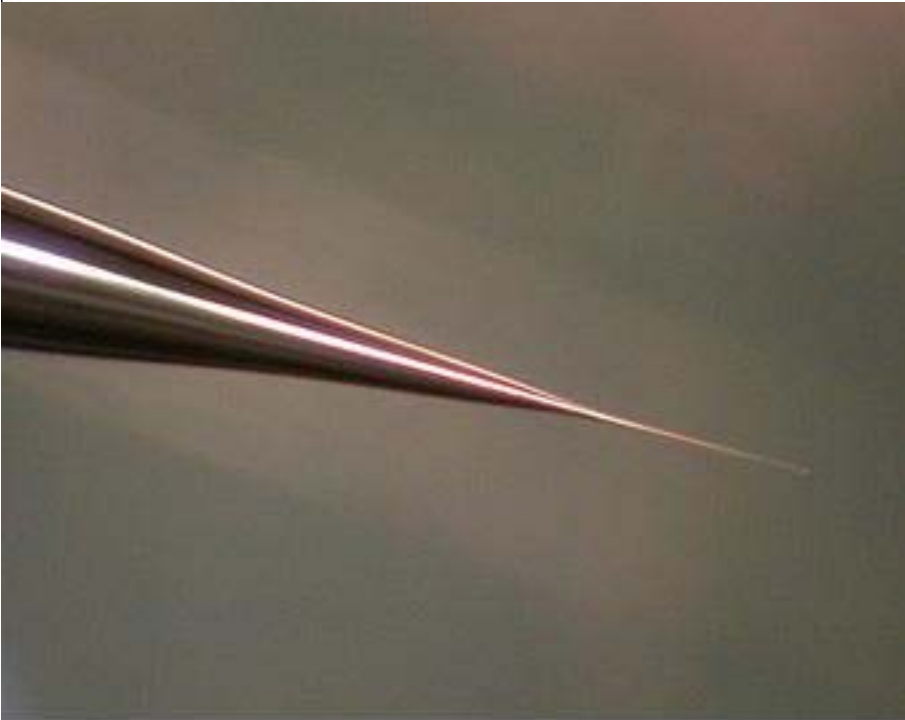
Kullanımdan önce nanoelektrosprey iğnesi (açıklığı nm boyutlarında)



Şekil 16

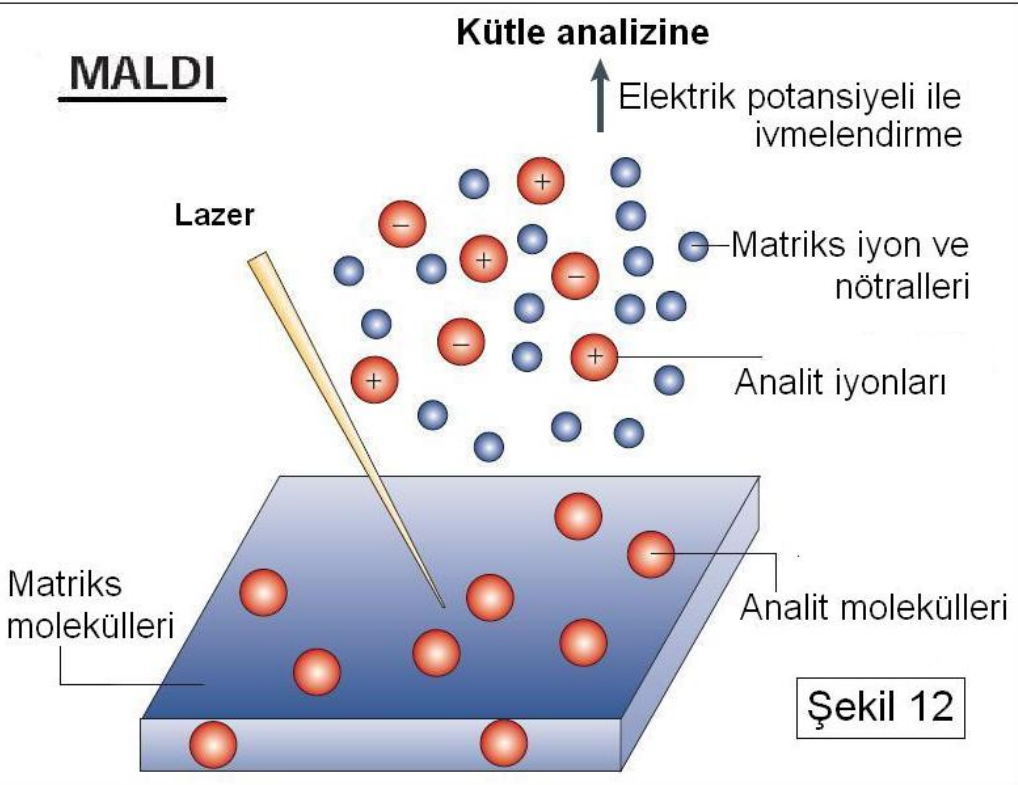
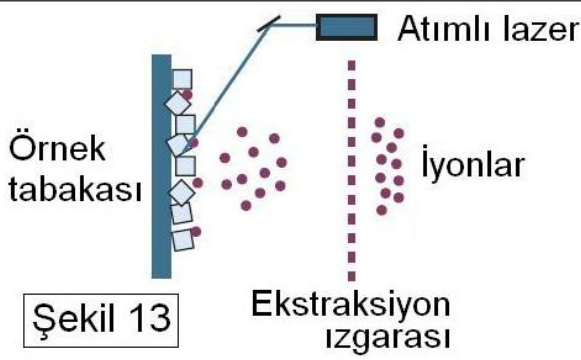
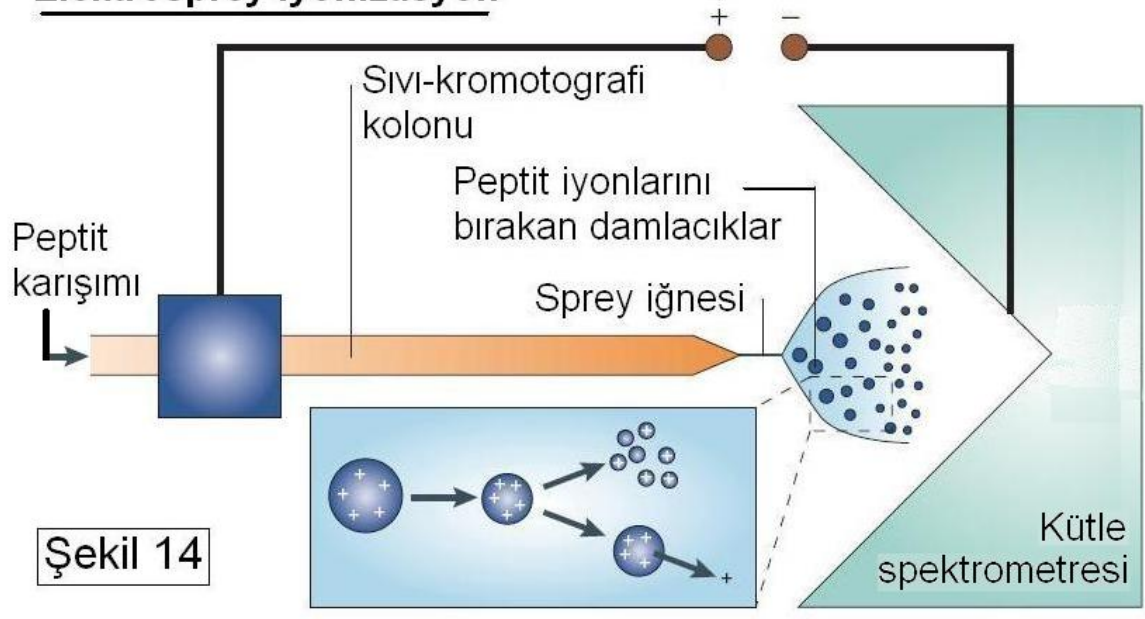
10 μm

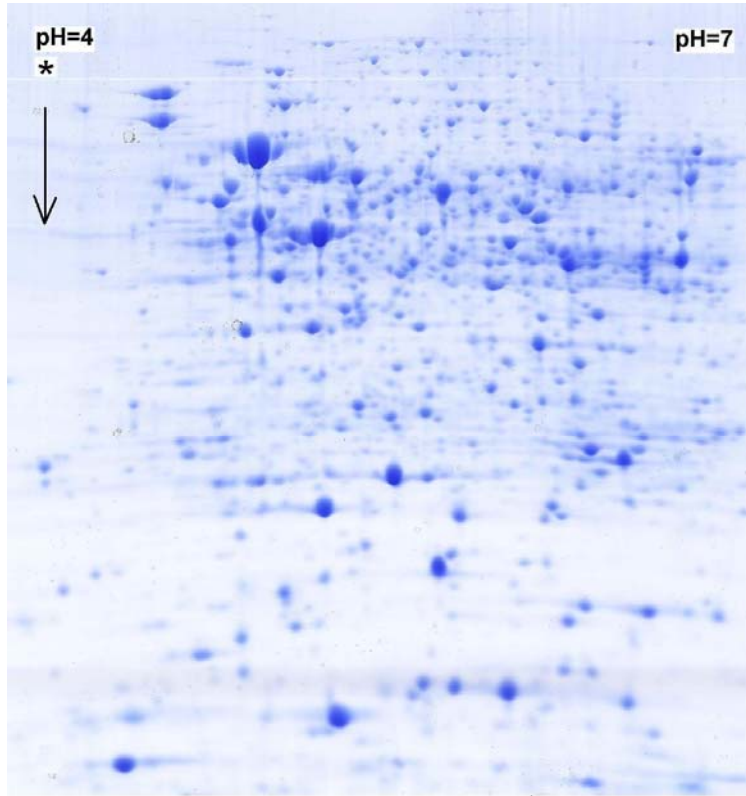
Kullanımdan sonra nanoelektrosprey iğnesi (açıklık boyutu 1 - 2 μm)



Şekil 15

Elektrosprey iyonizasyon

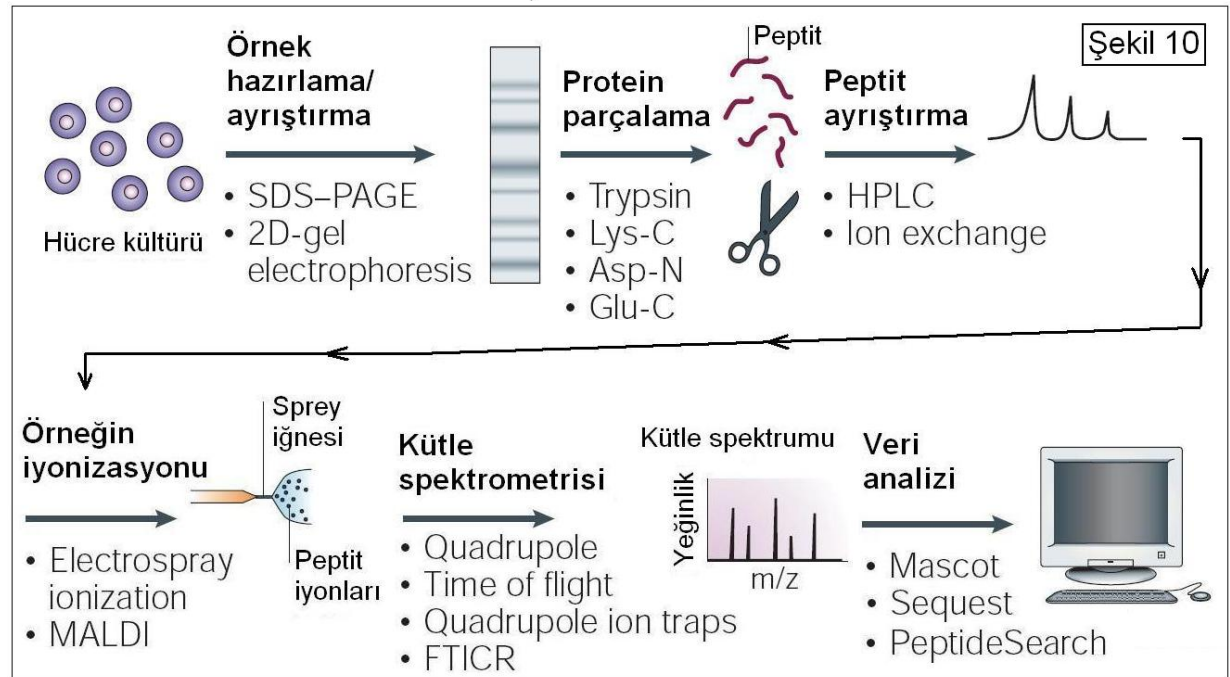




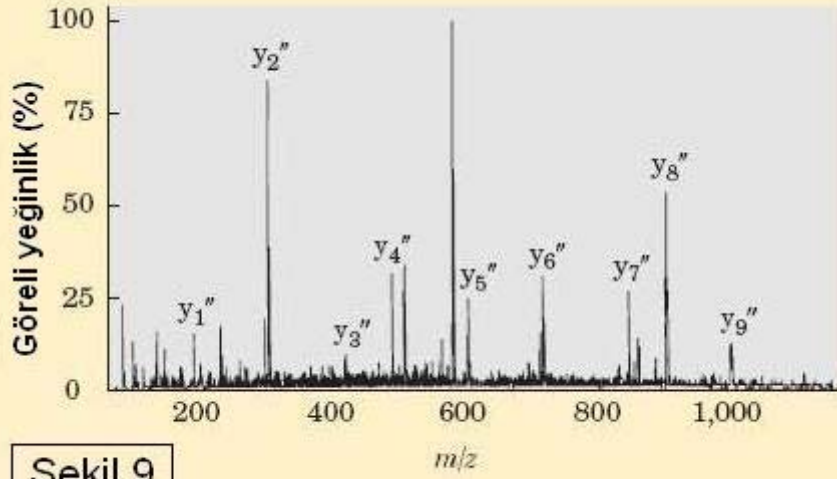
Şekil 11

1mg protein isoelectric focusing'den sonra %12-15 SDS'de yürütülmüş.

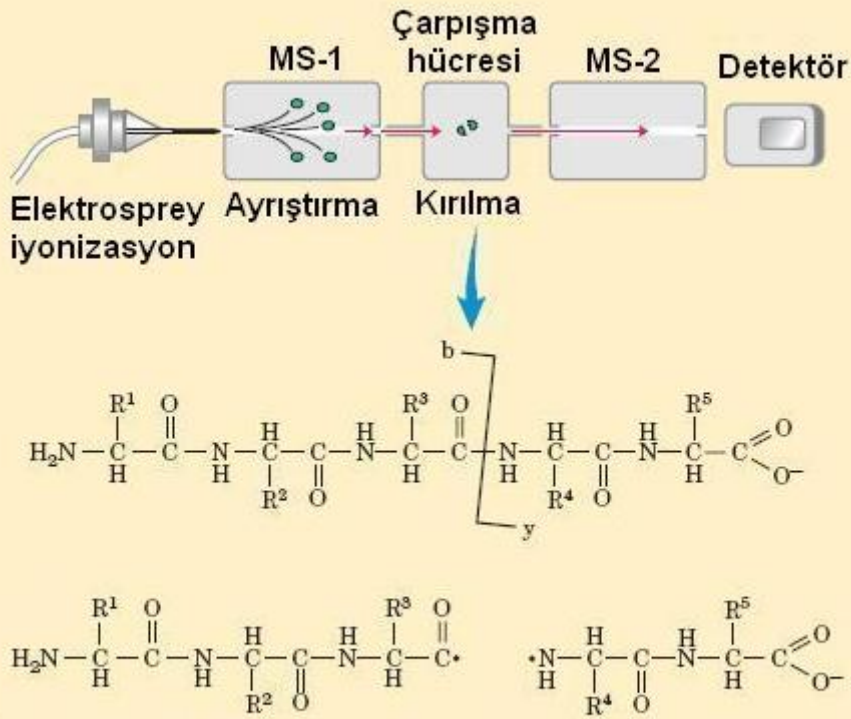
*:orijin
↓ SDS-PAGE yönü



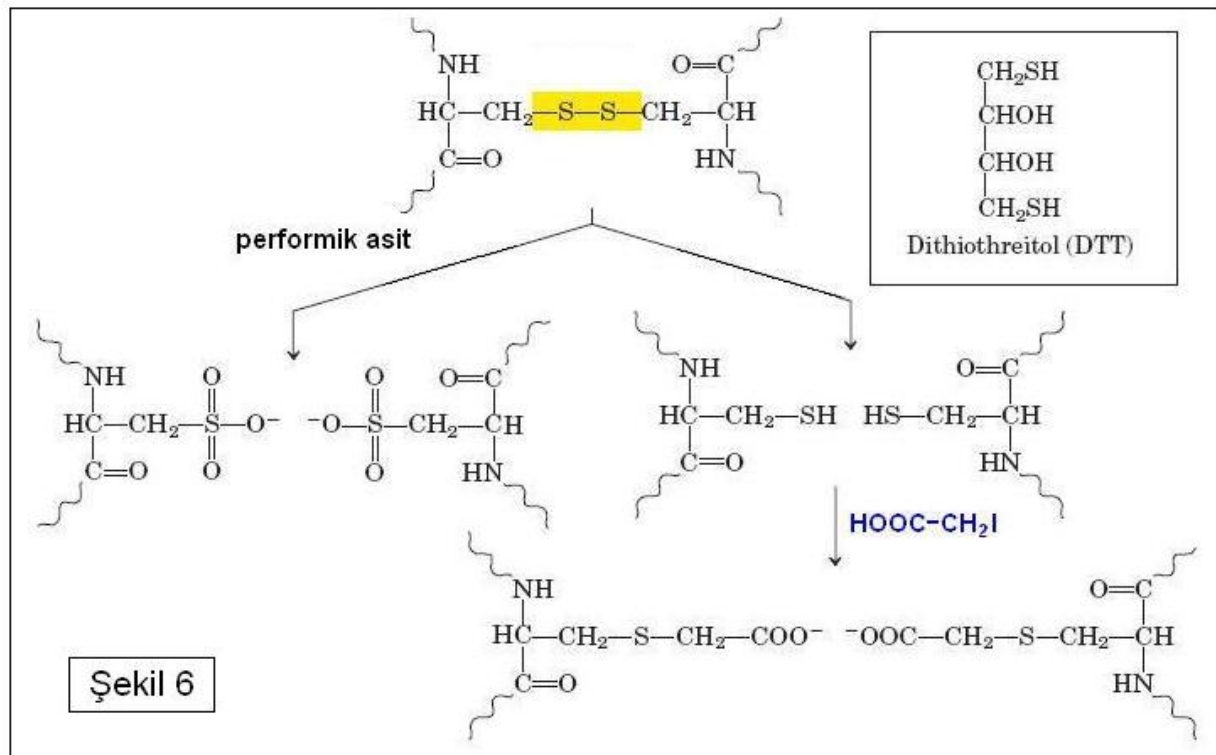
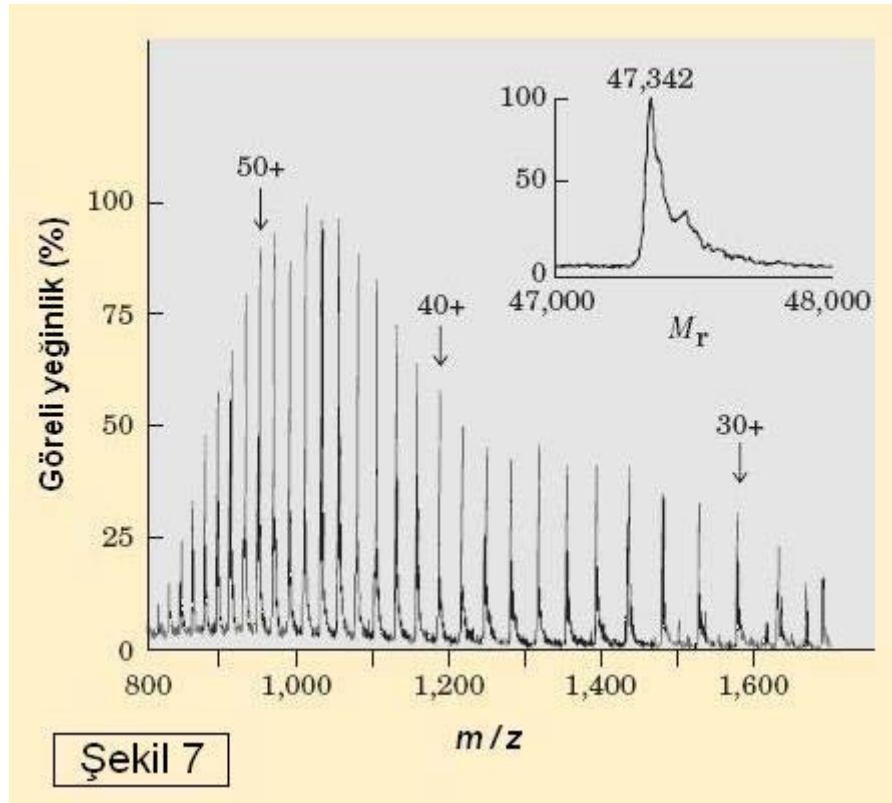
Şekil 10

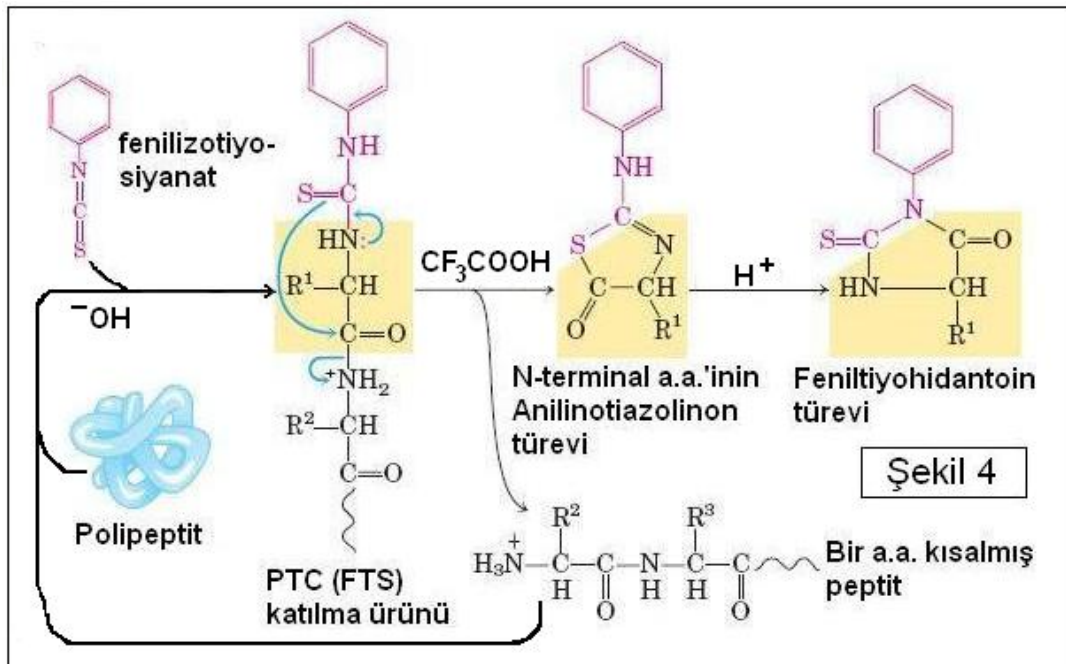
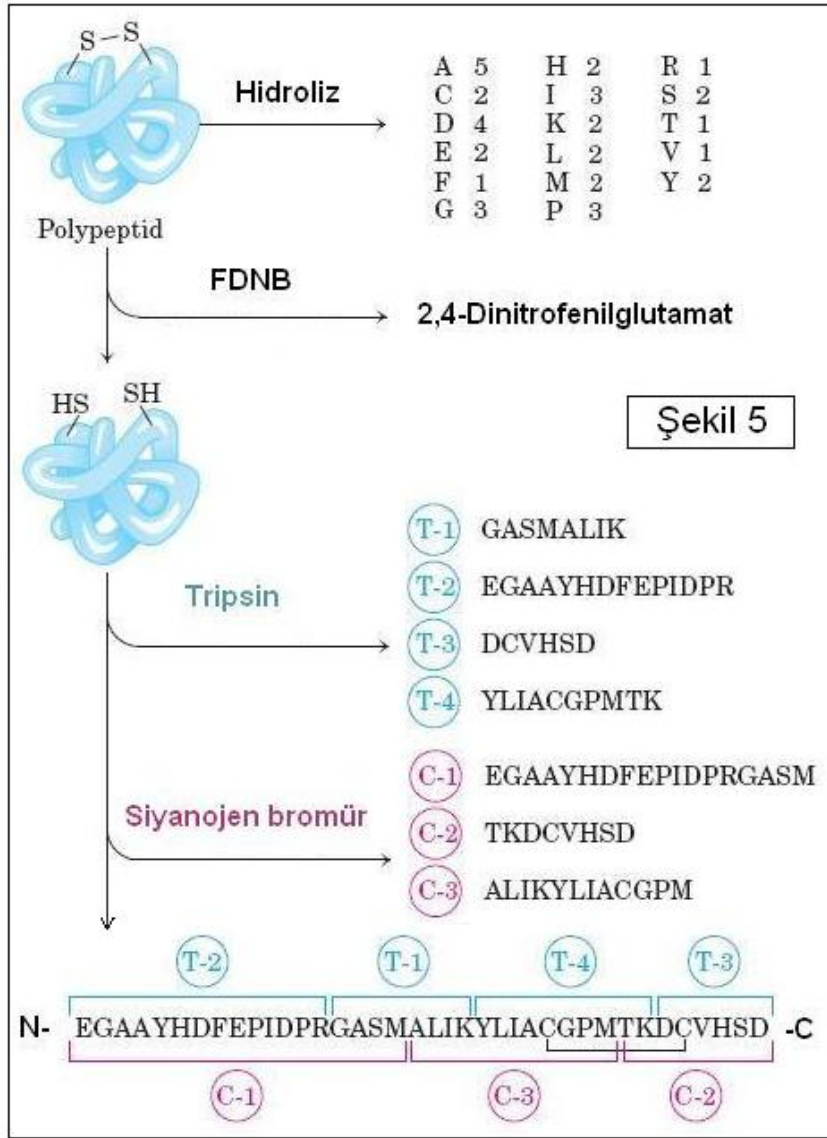


Şekil 9



Şekil 8





Şekil 3

