

**MATRİKS YARDIMLI LAZER DESORPSİYON/İYONLAŞMALI
KÜTLE SPEKTROMETRİSİNDE YAPILACAK PROTEOLİTİK
PARÇALANMA TEMELLİ PROTEOMİK ÇALIŞMALARI İÇİN,
ENZİM İMMOBİLİZE EDİLMİŞ SOL-JEL YÜZEYLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF PROTEOLYTIC ENZYME IMMOBILIZED
SOL-GEL TARGET SURFACES FOR DIGESTION BASED
PROTEOMIC STUDIES IN MATRIX-ASSISTED LASER
DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY**

ÖZLEM DEMİREL

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

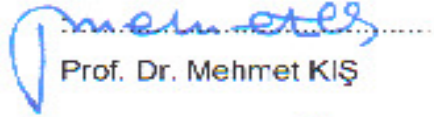
olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan


Prof. Dr. Mehmet KIŞ

Üye (Danışman)


Prof. Dr. Bekir SALIH

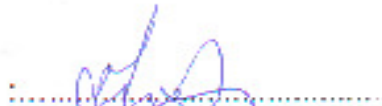
Üye


Prof. Dr. Belma IŞIK

Üye


Prof. Dr. Dilek ŞOLPAN ÖZBAY

Üye


Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Ailem'e....

MATRİKS YARDIMLI LAZER DESORPSİYON/İYONLAŞMALI KÜTLE SPEKTROMETRİSİNDE YAPILACAK PROTEOLİTİK PARÇALANMA TEMELLİ PROTEOMİK ÇALIŞMALARI İÇİN, ENZİM İMMOBİLİZE EDİLMİŞ SOL-JEL YÜZEYLERİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZLEM DEMİREL

ÖZ

Proteomiks, proteinlerin kapsamlı bir şekilde araştırılması olarak tanımlanmakta ve proteinlerin yapıları, fonksiyonları, ifade ve etkileşimleri ile kompleks biyolojik sistemlerdeki yerleşimlerini çözümlemeyi amaçlamaktadır. Bu tür analizlerden elde edilen bilgi, protein-protein etkileşimlerinin tanımlanmasıyla, her bir proteinin tek başına fonksiyonunun anlaşılmasına yardımcı olabilir. Tek başına genomik (DNA) veya transkriptomik (mRNA) yaklaşımlar, protein kararlılıklarını, yerleşimlerini ve sıkça protein fonksiyonlarının kritik belirleyici etkenlerinden olan post-translasyonel modifikasyonları dikkate almazlar.

Son yıllarda Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı-Kütle spektrometresi, proteinlerin tanımlanmasında ve biyolojik işlemlerdeki rollerinin belirlenmesinde önemli bir analitik araç haline gelmiştir. Proteomiks çalışmalarında etkin bir protokol, proteinin çeşitli yöntemlerle ayrılıp, saflaştırılması, enzimatik parçalanması ve MALDI-Kütle spektrometresinde “peptid kütle parmakizi” analizinin gerçekleştirilmesi işlemlerini içerir. Peptid kütle parmakizi analizi için anahtar faktör, proteinlerin genellikle tripsin gibi bir proteaz tarafından parçalanması işlemidir. Bu nedenle proteomiks çalışmalarının sonucu, enzimatik parçalama basamağının başarısı ile doğrudan ilgilidir. Protein karışımlarının parçalanması genellikle çözeltide serbest halde bulunan tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilir, ancak bu yaklaşımın birçok dezavantajı bulunmaktadır. Çözeltide serbest halde bulunan tripsinin birçok istenmeyen etkisi göz önüne alındığında, immobilize tripsin enziminin kullanımı, proteomiks çalışmaları için daha avantajlı bir yöntemdir. Serbest tripsin ile karşılaştırıldığında sol-jel materyallere immobilize edilen otokatalitik ürünler

oluşturmayan tripsin enzimi, yüksek enzimatik parçalama etkinliği, yüksek kararlılık ve otomasyon kolaylığı gibi üstünlüklere sahiptir.

Bu çalışmada, başlatıcı madde olarak kullanılan metal alkoksitlerin derişimleri değiştirilerek, farklı katkı maddeleri kullanılarak, alkol miktarı, pH ve jelleşme zamanları değiştirilerek çok çeşitli tripsin-tutuklanmış sol-jel malzemeleri üretilmiştir. Sentezlenen bu tripsin-tutuklanmış sol-jel malzemeler, BSA, sitokrom C ve ubiquitin gibi bazı proteinlerin enzimatik parçalanması işleminde kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen enzimatik parçalanma ürünü peptidler, MALDI-Kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmiş ve veritabanlarındaki sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Bu materyallerin yüzey morfolojilerinin ve termal kararlılıklarının anlaşılabilmesi için SEM fotoğrafları, FT-IR spektrumları ve TGA termogramları da elde edilmiştir. Tripsin-tutuklanmış sol-jellerin sentezindeki her parametrenin “peptid kütle parmakizi” analizine etkileri araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Proteomiks, sol-jel, tripsin enzimi ile parçalama, MALDI-Kütle spektrometresi

Danışman: Prof. Dr. Bekir SALİH, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

DEVELOPMENT OF PROTEOLYTIC ENZYME IMMOBILIZED SOL-GEL TARGET SURFACES FOR DIGESTION BASED PROTEOMIC STUDIES IN MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY

ÖZLEM DEMİREL

ABSTRACT

Proteomics represents the comprehensive study of proteins and is aimed at analyzing their structure, function, expression, interactions, and localization in complex biological systems. The information obtained from these types of analyses can contribute to our understanding of the function of individual proteins by identifying protein-protein interactions. Genomic (DNA) or transcriptomic (messenger RNA) approaches alone do not take into account changes in protein stability, localization, and posttranslational modifications that are often critical determinants of protein function.

Recently, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-MS has become an important analytical tool in the identification of proteins and evaluation of their role in biological processes. In proteomic studies, an efficient protocol consists of sample purification, separation of proteins by several methods, enzymatic digestion and identification of proteins by MALDI-MS analysis to peptide mass fingerprint. A key element for peptide mass fingerprint analysis is the digestion of protein mixtures by a protease, in most cases, by trypsin. Thus the success of proteomics study is concerned with the achievement of enzymatic digestion step. The protein mixture is often digested by free trypsin in solution however, there are several disadvantages for this approach. Because of all unfavorable effects of free trypsin are taken into account, immobilized trypsin enzyme access is more favored method for proteomics analysis. Compared with free trypsin, the trypsin immobilized on sol-gel materials has the advantages of high digestion efficiency, high stability and easy to automation.

In this study, different trypsin-encapsulated sol-gel materials were fabricated by changing the concentration of the starting metal alkoxides, using different additives,

changing the amount of alcohol, pH and the gelation time. Synthesized these materials were used to perform the enzymatic digestion of some proteins namely BSA, cytochrome C and ubiquitin. The resulting peptides were analyzed by MALDI-mass spectrometer and compared with database results. SEM micrographs, FT-IR spectra and TGA thermograms of these materials were also obtained for understanding of their surface morphologies and thermal stabilities. Every parameters in trypsin-encapsulated sol-gel synthesis and their effects on "peptide mass fingerprint analysis" have been investigated.

Keywords: Proteomics, sol-gels, trypsin digestion, MALDI-MS

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH, Hacettepe University, Department of Chemistry

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde danışmanlığımı yapan, tez çalışmam boyunca bilimsel bakış açısı edinmemi ve mesleki gelişimimi sağlayan, destek ve yardımlarını hiç esirgmeden hep yanımda olan, öğrencisi olduğum için her zaman gurur ve mutluluk duyduğum ve hayatım boyunca her yönü ile örnek alacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Bekir SALİH'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında değerli fikir ve tecrübelerinden yararlandığım, beni yüreklendiren, konu üzerinde yaptığımız tartışmalarla bana fikir veren ve tavsiyelerde bulunan, benim için her zaman çok iyi bir öğreten, bir abi ve bir dost olan Araş. Gör. Ömür ÇELİKBIÇAK' a,

Her zaman beni sabırla dinleyen, umutsuzluğa düştüğümde beni cesaretlendiren, yardımlarını, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman bana güç veren ve kendilerini tanıdığım için yaşadığım mutluluğu tarif edemeyeceğim, benim için çok değerli olan arkadaşlarım Araş. Gör. Aslı ÇAL ve Araş. Gör. Cansel TAŞAĞIR' a,

Çok fazla birlikte çalışma fırsatı bulamasak da, yardımseverlikleri ve arkadaşlıkları anlatmakla bitirilemeyecek olan, her zaman olumlu katkılarını ve karşılıksız yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Basri GÜLBAKAN ve Mehmet ATAKEY' a,

Sıcacık bir aile ortamı sağladığımız, dostluğun ve özverinin anlamını birlikte kavradığımız tüm arkadaşlarım, Ülkü, Selim, Niyazi, Burak, Derya, Burçin ve diğer tüm SAREG üyelerine,

Yaşamın güçlükleriyle birlikte mücadele ettiğimiz, sıkıntılarımı benimle birlikte paylaşan ve her zaman sevgisini hissettiğim, benim için çok değerli olan Erkan ÇAKIR' a,

Son olarak, hayatımın her anında yanımda olan, yaptığım tüm işlerde beni cesaretlendiren ve benim için her türlü özveride bulunan sevgili aileme,

yaşamın güzelliğine olan tüm inancımla, sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
EKLER DİZİNİ.....	xv

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
-----------------------------------	---

2. GENEL BİLGİLER	4
-------------------------	---

2.1. Sol-Jeller.....	4
2.1.1. Sol-jel kimyası ve teknolojisi.....	4
2.1.2. Sol-jel işlemi	4
2.1.3. Sol-jel işleminin basamakları	6
2.1.3.1. Hidroliz ve kondenzasyon.....	8
2.1.3.2. Jelleşme.....	9
2.1.3.3. Yaşlandırma.....	10
2.1.3.4. Kurutma	10
2.1.3.5. Yoğunlaşma.....	10
2.1.4. Enzim immobilizasyonu	12
2.1.4.1. Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri.....	15
2.1.4.2. Çözünür formda immobilizasyon.....	19
2.1.5. Sol-jel yöntemiyle biyomoleküllerin immobilizasyonu	20
2.1.5.1. Sol-jel işlemiyle proteinlerin tutuklanması	22
2.1.5.2. Tutuklanmış proteinlerin yararlanılabilirliği.....	25
2.1.5.3. Sol-jel başlatıcı türleri ve matris	26
2.2. Kütle Spektrometrisi.....	30
2.2.1. Kütle spektrometrisinin genel prensipleri.....	30

2.2.1.1. İyonlaştırma	31
2.2.1.2. Kütle analizörü	32
2.2.1.3. Dedektörler	32
2.2.2. Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaşmalı - uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF/MS)	34
2.2.2.1. İyonlaştırma prensipleri.....	35
2.2.2.2. Uçuş zamanlı analizörde kütle analizi	38
2.2.2.3. İyonların belirlenmesi.....	40
2.2.2.4 Ayırıcılık	41
2.2.2.5 Örnek hazırlanması	42
2.3. Proteomiks.....	44
2.3.1. Genomiks ve proteomiksin kökeni	45
2.3.2. Niçin proteomiks çalışılır?.....	46
2.3.3. Proteomikte yol haritası	48
2.3.3.1 Proteinlerin izolasyonu ve ayrılması	50
2.3.3.2 Proteinlerin yapılarının belirlenmesi.....	53
2.3.3.3 Veritabanlarının kullanılması.....	53
2.3.4. MALDI-MS / PMF (Peptit Kütle Parmakizi) yöntemi	55
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	58
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	58
3.2. Tripsin Tutuklanmış Sol-Jellerin Sentezi	58
3.2.1. Alkol miktarı değişiminin etkisi.....	59
3.3. Karakterizasyon	59
3.3.1. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopi	59
3.3.1.1. FT-IR örneklerinin hazırlanması.....	59
3.3.2. Taramalı Electron Mikroskopisi (SEM)	60
3.3.2.1. SEM örneklerinin hazırlanması	60
3.3.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)	60
3.4. Tripsin Tutuklanmış Sol-jellerin Proteomiks Çalışmaları İçin Kullanımı	60
3.4.1. Diğer protein parçalama (Digestion) yöntemleri	61

3.4.1.1. Proteinlerin çözeltide parçalanması	61
3.4.1.2. Proteinlerin Poli-akrilamid jel içerisinde parçalanması	61
3.5. MALDI-Kütle Spektrometresi	62
3.5.1. MALDI örneklerinin hazırlanması	62
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	64
4.1. Karakterizasyon	69
4.1.1. SEM analizi	70
4.1.2. TGA analizleri.....	74
4.1.3. FT-IR analizleri	77
4.2. MALDI-Kütle Spektrometresi ile Analizler	79
5. SONUÇLAR.....	103
KAYNAKLAR DİZİNİ	106
ÖZGEÇMİŞ	132

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sol-Jel işleminin şematik gösterimi.	5
Şekil 2.2. Silisyum temelli sol-jel işleminin basamakları.	7
Şekil 2.3. Enzim ve matriksin etkileşimi ile ortaya çıkan immobilize enzimin özellikleri.	14
Şekil 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	15
Şekil 2.5. Çapraz bağlama ile immobilizasyon.	16
Şekil 2.6. Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması.	17
Şekil 2.7. Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi.	17
Şekil 2.8. Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu.	18
Şekil 2.9. Çözünür formda immobilizasyon.....	19
Şekil 2.10. Sol-Jel türevi biyokompozitlerin üretimi.....	24
Şekil 2.11. Sol-Jel türevi materyallere tutuklanan proteinlerin, mümkün olan tutuklanmış formları.....	26
Şekil 2.12. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri	31
Şekil 2.13. Matriks yardımcı lazer desorpsiyonunun prensibi.	36
Şekil 2.14. Lineer uçuş zamanlı kütle analizörünün prensibi: iyonlar, kütle/yük oranlarına göre farklı hızlarda hareket ederler.	39
Şekil 2.15. Yansıtıcı (Reflektron) modda TOF analizörünün prensibi.	40
Şekil 2.16. Yarı yükseklikteki pik genişliği (FWHM) ifadesiyle ayırıcılık tanımı.	41
Şekil 2.17. Kurutulmuş damlacık metodunun prensibi.	43
Şekil 2.18. Hızlı buharlaştırma metodunun prensibi.	43
Şekil 2.19. Proteomiks türleri ve biyolojideki kullanım alanları.....	45
Şekil 2.20. Proteomiks çalışmasının temel basamakları.....	49
Şekil 2.21. Proteomiks çalışmalarındaki genel iki yaklaşım.....	51
Şekil 2.22. Peptit kütle parmak-izi analizi için tripsin enzimi ile protein parçalanması.....	56
Şekil 4.1. Sol-Jel başlatıcılarının karışabilirliğini gösteren üçlü-faz diyagramı (Brinker ve Scherer, 1990).	65
Şekil 4.2. Sol-jel işlemi a) Asit katalizli b) NaF katalizli.	69

Şekil 4.3. Tripsin tutuklanmamış TEOS sol-jel materyali (BOŞ-TEOS; 1 mL TEOS, 0.6 mL metanol ve 20 mM 0.1mL NaF).....	70
Şekil 4.4. Sol-jellerin SEM fotoğrafları. (A) Tripsin tutuklanmamış TEOS (BOŞTEOS) sol-jeli. (B) Tripsin tutuklanmış TEOS1 sol-jeli. (C) Tripsin tutuklanmış TMOS sol-jeli. Büyütme oranları X1000 olarak verilmiştir.	72
Şekil 4.5. PEG katkı maddesi kullanılarak sentezlenen bazı sol-jellerin SEM fotoğrafları.	73
Şekil 4.6. Tripsinin TG ve DTG eğrileri.	75
Şekil 4.7. BOŞTEOS sol-jelinin TG ve DTG eğrileri. (Ti=92.00 Tf=740.00).....	75
Şekil 4.8. TEOS 1 sol-jelinin TG ve DTG eğrileri.	76
Şekil 4.9. BOŞTEOS2, TEOS20 (20 mg tripsin doplanmış TEOS1) ve TEOS20YIK (yıkamış) sol-jellerinin TG eğrileri.	77
Şekil 4.10. FTIR Spektrumları. (A) Enzim tutuklanmamış TEOS başlatıcı ile sentezlenen sol-jel (BOŞTEOS) (B) Enzim tutuklanmış TEOS başlatıcı ile sentezlenen sol-jel (TEOS1) (C) Tripsin.	78
Şekil 4.11. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisi.....	81
Şekil 4.12. TEOS2 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisi.....	82
Şekil 4.13. TEOS3 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisi.....	82
Şekil 4.14. TEOS4 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisi.....	83
Şekil 4.15. BOŞTEOS (Tripsin tutuklanmamış) sol-jeli ile yapılan kontrol amaçlı BSA parçalama çözeltisi.....	83
Şekil 4.16. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu	85
Şekil 4.17. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama işlemi sonrasında gerçekleştirilen 1. yıkama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	85
Şekil 4.18. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama işlemi sonrasında gerçekleştirilen 2. yıkama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu	86
Şekil 4.19. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama işlemi sonrasında gerçekleştirilen 3. yıkama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu	86
Şekil 4.20. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama işlemi sonrasında gerçekleştirilen 4. yıkama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	87

Şekil 4.21. TEOS1 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	88
Şekil 4.22. TEOS2 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	89
Şekil 4.23. TEOS3 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	89
Şekil 4.24. TEOS4 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	90
Şekil 4.25. TEOS1 sol-jelinin BSA parçalama çözeltilerinden elde edilen MALDI-Kütle spektrumları. (A) 3. parçalama çözeltisi, (B) 5. parçalama çözeltisi, (C) 8. parçalama çözeltisi ve (D) 9. parçalama çözeltisi.	91
Şekil 4.26. TMOS sol-jelinin BSA parçalama çözeltilerinden alınan MALDI-Kütle spektrumları. (A) 1. parçalama çözeltisi ve (B) 2. parçalama çözeltisi.	92
Şekil 4.27. TMOS sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisinde yüksek molekül ağırlıklı bölgede alınan MALDI-Kütle spektrumu.	93
Şekil 4.28. TEOS1 sol-jeli ile gerçekleştirilen protein parçalama işleminde BSA miktarı azaltma çalışmasına ait MALDI-Kütle spektrumları. (A) 50 µg BSA, (B) 25 µg BSA (C) 10 µg BSA ve (D) 5 µg BSA.	95
Şekil 4.29. PEG kullanılarak sentezlenen sol-jellerin 1. BSA parçalama çözeltilerine ait MALDI-Kütle spektrumları.	97
Şekil 4.30. PEG8 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	98
Şekil 4.31. PEG8 sol-jelinin Sitokrom C parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	99
Şekil 4.32. PEG8 sol-jelinin Ubiquitin parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.	99
Şekil 4.33. Jel elektroforez yöntemiyle saflaştırılan ve Poliakrilamid jel içerisinde kalan BSA proteininin, serbest tripsin enzimi ile parçalanması sonucu elde edilen MALDI-Kütle spektrumu.	100
Şekil 4.34. BSA proteininin çözelti içerisinde serbest tripsin enzimi ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltiden alınan MALDI-Kütle spektrumu.	101

Şekil 4.35. Sol-jel yapısı içerisine tutuklanmış tripsin enzimi ile gerçekleştirilen BSA parçalama işleminden sonra elde edilen çözeltiden alınan MALDI-Kütle spektrumu. 102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sol-Jel işlemi kullanılarak, inorganik-organik hibrit materyallerin hazırlanması için kullanılan bazı metal alkoksit başlatıcılar.....	13
Çizelge 2.2. Biyoimmobilize Sol-Jellerin Önemli Özellikleri ve Avantajları.....	29
Çizelge 2.3. Biyokimyasal analizlerde MALDI matriksi olarak kullanılan bazı matriks molekülleri.	37
Çizelge 2.4. MALDI-MS de kullanılan Lazer kaynakları.....	37
Çizelge 4.1. Sol-jel sentezinde başlatıcı madde değişimi.....	64
Çizelge 4.2. Alkol miktarı değişimine bağlı olarak sentezlenen sol-jeller.	66
Çizelge 4.3. Polietilen Glikol etkisi (Burada sentezler; Her bir sol-jel materyali için; 1 mL başlatıcı madde, 1 mL 2mg/mL tripsin çözeltisi ve 20 mM 0.1 mL NaF kullanılarak gerçekleştirilmiştir).....	67
Çizelge 4.4. Katalizör değişimi (Bu aşamada sentezler; 1 mL TEOS, 1 mL 2 mg/mL tripsin çözeltisi ve 0.6 mL metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir).....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	Asetonitril
APS	Amonyum persülfat
BSA	Sığır Serum Albumin
CHCA	α -siyano-4-hidroksisinnamik-asit
CI	Kimyasal iyonlaştırma
DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
DTT	Ditiyotreitöl
EI	Elektron Bombardımanlı
ESI	Elektro Sprey İyonlaşmalı
FT-IR	Fourier Transform Infrared
FAB	Hızlı atom bombardımanlı
GC-MS	Gaz kromatografi-kütle spektrometresi
IEF	İzoelektrik odaklama
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon / İyonlaşmalı
μ L	Mikrolitre
MS	Kütle Spektrometresi
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SA	3-5-dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit (sinapinik asit)
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil-etilendiamin
TFA	Trifloro asetik asit
THF	Tetrahidrofuran
TOF	Uçuş zamanlı

EKLER DİZİNİ

EK 1: Bu çalışmada kullanılan biyomoleküllerin amino asit dizilimleri ve kimyasal formülleri.	117
EK 2: Bu çalışmada kullanılan proteinlerin teorik peptid parçalanma ürünlerinin listesi.	118

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Bilindiği üzere, proteinler hücre içinde çok önemli fonksiyonlara sahiptirler. Çünkü hücre içindeki yerleşimleri, yapıları, post-translasyonel modifikasyonları ve etkileşimleri yaşamsal anlamda büyük önem taşımaktadır. Organizmadaki işlevsel moleküller olan proteinler, genler tarafından kodlanırlar. Hücre çekirdeğinde binlerce gen bulunmakta, bu genlerin ürünü olarak proteinler meydana getirilmekte ve her bir protein özgün fonksiyonlar göstermektedir. Son 20 yıl içerisinde, çok yoğun bir şekilde değişik organizmalardaki gen yapıları incelenmiş ve özellikle 1990 yılında başlatılan “İnsan Genom Projesi” kapsamında, insan ve diğer birçok organizmanın gen yapıları büyük oranda aydınlatılmıştır. 2001 yılında, Celera Genomics şirketinden, Dr. Craig Venter ve araştırmacıları, insan genomu taslağını ve elde edilen tüm verileri açıklamış ve böylece gen haritaları oluşturulmuştur. İnsanlık tarihinin en önemli araştırmalarından biri olarak kabul edilen bu çalışmada, en çarpıcı sonuç bir gen = bir protein hipotezinin doğru olmadığına kanıtlanmasıyla elde edilmiştir ve bu noktada, canlı organizmalara ait birçok bilginin yalnızca genom çalışmaları yürütülerek elde edilemeyeceği anlaşılmıştır (Tyers ve Mann, 2003). Genom araştırması, diğer deyişle bir organizmanın sahip olduğu genomun en detaylı biçimde aydınlatılması, organizmanın gerçek potansiyeli hakkında ancak sınırlı ölçüde bilgi sağlar. DNA dizi analizi yapılmış genlerin tanımlanması, organizmanın bu genleri hangi oranda kullandığı ve karşılaşacağı durumlara hangilerini kullanarak yanıt vereceğini göstermez. Gen ifade profillerinin belirlenmesi, gen ürünlerinin modifikasyonları, hücrede bulundukları yerler ve göreceli miktarlarının anlaşılması için post-genomik araçların kullanılması gerekir. Proteinlerin fonksiyonel karakterizasyonu günümüzde en önemli problemlerden biridir. Bir proteinin yapısı, fonksiyonunu belirlemekte anahtar rol oynamaktadır. Bu amaçla proteinlerin, birincil ve ikincil yapıları dahil, üç boyutlu yapıları belirlenmeye çalışılmaktadır. Proteom, belirli bir zaman ve mekanda bir organizmanın sahip olduğu ve ifade ettiği tüm farklı proteinlerin toplamıdır. “Farklı proteinler” kavramı, sadece genler tarafından kodlanan polipeptid yapıları değil, aynı zamanda sentez sonrası modifikasyonlara uğrayan proteinleri de içermektedir. Proteomik ise daha dinamik bir terim olup, farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin analiz teknolojisi olarak tanımlanır (Anderson ve Anderson, 1996). Proteomik çalışmalarında en

etkin yol ilk aşamada proteinlerin ağırlık ve elektrik yüklerine göre yüksek çözünürlükle ayrıştırıldıkları iki boyutlu elektroforez jellerinin (two-dimensional, 2D) elde edilmesi ve gerekli yazılımlar kullanılarak incelenecek proteinlerin belirlenmesini, ikinci aşamada proteinlerin tripsin gibi proteolitik enzimlerle peptid parçalarına bölünmesi ve özel kütle spektrometrik yöntemlerden olan Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı-Kütle Spektrometresi (MALDI-MS) ve Elektro Sprey İyonlaşmalı-Kütle Spektrometresi (ESI-MS) gibi yöntemlerle bu proteinlerin peptid kütle parmak izlerinin elde edilmesini ve son aşamada elde edilen bulguların genomik veri tabanı ve bioinformatik yazılımlar kullanılarak analizi sonucu proteinlerin tek tek tanımlanmasını içerir. MALDI-MS tekniği proteinler, peptidler, DNA ve RNA zincirleri, sentetik ve doğal organik ve inorganik polimerler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerin analizinde ve ayrıntılı yapı tayinlerinin gerçekleştirilmesinde, günümüzde anahtar rol oynayan bir tekniktir. MALDI-MS bir yumuşak iyonlaşma (soft ionization) tekniği olması nedeniyle bu tür maddeleri parçalamadan bir bütün olarak iyonlaştırarak izlenmelerine olanak verir.

Proteinlerin seçimli bir şekilde peptid parçalarına enzimatik olarak parçalanmaları, proteomik çalışmalarının önemli bir adımıdır. Çözeltide veya jelde, proteinleri serbest tripsin ile parçalama işlemleri, çok zor ve uzun süreli (ortalama 2 - 48 saat arası sürebilen) protokollerin uygulanmasını gerektirir ve bu protokollerin tekrarlanabilirlikleri düşüktür (Kinter ve Sherman, 2000). Bunlara ek olarak çalışmalarda kullanılan proteolitik enzimler oldukça pahalıdır. Çözeltide protein parçalanmasını gerçekleştirdikten sonra, tripsinin tekrar kullanılması mümkün değildir. Çözeltide tripsin ile gerçekleştirilen parçalama işleminden sonra MALDI-MS analizlerinden elde edilen spektrumlarda ayrıca serbest tripsinin otolizinden kaynaklanan tripsine ait peptid pikleri de gözlenir. Bu durum, peptid kütle parmak izini belirlemek istediğimiz proteinin analizini güçleştirir. Tüm bu yaklaşımlar çerçevesinde, tripsin ve benzeri enzimlerin immobilizasyon çalışmaları, bu olumsuz etkileri ortadan kaldırabilmek açısından oldukça önemlidir. Günümüzde yeni bir teknoloji olarak karşımıza çıkan bir teknik ile, sol-jel yapılarına proteolitik enzimlerin immobilizasyon çalışmaları bir çok olumlu özelliklerinden dolayı önem kazanmaktadır. Biyoimmobilizasyon çalışmaları için dikkat çekici olan bu yeni teknikle biyolojik bileşenlerin, düşük sıcaklıkta gerçekleşen sol-jel metoduyla

oluşturulan inorganik silikat matrikslerine tutuklanması işlemi oldukça yoğun çalışılan bir konu olmuştur. (Braun ve ark., 1992; Avnir ve ark., 1994; Livage ve ark., 1996). 1990’da Avnir ve çalışma arkadaşları, proteinlerin sol-jel metoduyla sentezlenen alkoksisilan türevi silikatlara immobilizasyonu ve tutuklanmasını açıklayan, çok önemli anahtar bir makale yayınladı. Bu çalışmada, aspartaz ve alkalın fosfataz enzimlerini de içeren bir enzim serisinin, tetraetilortosilikat (TEOS) türevi sol-jellere, enzimatik aktivitelerini kaybetmeden tutuklanabildikleri gösterilmiştir. Bu çalışmayı takiben, 1992’de Zink’in grubu, tetrametilortosilikat (TMOS) türevi silikatlara, sitokrom C ve miyoglobulin gibi proteinleri, O₂ bağlama kabiliyetlerini kaybetmeden tutuklamayı başarmışlardır. Literatürdeki bu çalışmaların ışığında, sunulan bu çalışmada, tripsin tutuklanmış çeşitli sol-jel materyalleri sentezlenmiş ve proteomiks çalışmaları için kullanılmıştır.

Bu çalışmada esas olarak, tripsin enziminin aktivitesini kaybetmeden uygun bir sol-jel materyaline tutuklanması ve proteinlerin peptid haritalarının çıkarılması çalışmalarında, uzun süre tekrar tekrar kullanılabilmesi hedeflenmiştir. MALDI-MS sisteminde kullanılabilecek, proteinlerin seçimli olarak parçalanma işleminin gerçekleştirilebileceği enzim immobilize edilmiş hedef yüzeylerin geliştirilmesi ile sentezlenen materyallerin karakterizasyonu ve çeşitli proteinlerin peptid kütle parmakizi analizlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçlar doğrultusunda sentez çalışmalarının, proteinlerin kararlılıklarını koruyabilecekleri koşullarda gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Bu anlamda sol-jel sentez işlemleri, düşük sıcaklıklarda çalışılabilen ve atmosferik şartların yeterli olduğu, kolaylık ve başlatıcı maddelerinin ucuzluğu gibi birçok avantaj göz önüne alındığında, ön plana çıkan bir işlem olmuştur.

Özetle çalışmada, tripsin enziminin yapısını ve aktivitesini bozmayacak koşullarda ve bir çok farklı etkenin değiştirilmesiyle çok çeşitli sol-jel yapıları sentezlenmiş ve sentezlenen bu jellerin, proteinlerin peptid kütle parmakizi analizlerinde ne kadar etkin kullanılabildikleri araştırılmıştır. Sentezlenen tripsin immobilize edilmiş sol-jellerin, farklı proteinlerin seçimli paralanmalarında gösterdikleri davranışlar incelenerek amaca en uygun sol-jel sentez yönteminin ve yapısının belirlenmesine çalışılmıştır. Ayrıca sentezlenen tüm jellerin yüzey karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve termal özellikleri de incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sol-Jeller

2.1.1. Sol-jel kimyası ve teknolojisi

Son yıllarda seramik ve cam alanlarında önem kazanan işlemlerden biri sol-jel reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar, silikon veya metal alkoksit monomer başlatıcılarından çeşitli inorganik ağ yapılarının üretilmesini sağlar. İlk olarak 1800'lerin sonlarına doğru keşfedilmiş olsa da, 1930'lardan bu yana yaygın olarak çalışılmıştır. 1970'lerin başında, monolitik inorganik jellerin düşük sıcaklıkta üretildiği ve yüksek sıcaklık gerektiren erime işlemi olmaksızın cama dönüştürüldüğü çalışmalar, sol-jel kimyasının yeniden canlanmasını sağlamıştır (Hench ve West, 1990; Lev, 1995; Brinker ve Scherer, 1990). Bu işlemle, dayanıklılığı, optik geçirgenliği, kimyasal kararlılığı, gözenek büyüklüğü ve ısısal dayanıklılığı istenildiği şekilde ayarlanabilen, homojen, inorganik oksit materyaller oda sıcaklığında sentezlenebilir. Sol-jel matriksler uygun metal alkoksitlerin kondenzasyonu yoluyla sentezlenir. Reaksiyonu katalizlemek için katalizör fazlası kullanılır ve gözenek büyüklüğü, gözenek hacmi ve yüzey kimyası kontrol edilebilen materyaller elde edilir (Pierre, 2004). Geleneksel inorganik cam ve seramik üretimlerinde çok yüksek erime sıcaklıklarına gereksinim duyulur (Brinker ve Scherer, 1985; Keefer, 1990). Kullanılmak istenen amaç doğrultusunda, sol-jel işlemiyle sentezlenen cam ve seramikler, monolit, film, fiber, tek boyutlu toz yapılar gibi çeşitli formlarda üretilebilir. Bu materyallerin bazı özel kullanım alanları ise, optikler, koruyucu ve gözenekli filmler, optik kaplama, pencere yalıtımı, dielektrik ve elektronik kaplamalar, yüksek sıcaklık süper iletkenleri, dayanıklı fiberler ve katalizörler olarak örneklendirilebilir (Keefer, 1990). Ayrıca sol-jellerin, organik ve inorganik moleküllerin immobilizasyonu (Brinker ve Scherer, 1990), ilaç salınımı ve tıbbi implantasyon (Livage ve ark., 2001; Hench, 1998) gibi potansiyel kullanım alanları vardır (Rodgers, 2006).

2.1.2. Sol-jel işlemi

Genel olarak sol-jel işlemi, alkoksit başlatıcıların asidik veya bazik ortamda hidrolizini ve bunu takiben hidrolize uğrayan birimlerin kondenzasyon ve

alkoksit başlatıcıların M(OR)_n düşük molekül ağırlıklı organik çözeltileriyle başlar. Burada M; Si, Ti, Zr, Al, B gibi ağı oluşturur metal elementini, R; ise alkil grubu veya suyu temsil eder. Hidroliz reaksiyonu önce tepkimeyi başlatır ve ardından kondenzasyon reaksiyonları devam eder. Sol-jel dönüşümü sırasında, çözeltinin viskozitesi giderek artar. Sol (1-100 nm boyutunda çok küçük parçacıkların oluşturduğu koloidal süspansiyon) sağlam, gözenekli bir ağ yapısı olan jele dönüşür. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonlarının her ikisinde de alkol ve su gibi düşük molekül ağırlıklı yan ürünler oluşur. Bu su ya da alkol molekülleri sistemden uzaklaştırılarak, tetrahedral SiO₂ ağ yapısı oluşturulmuş olur. Silisyum temelli sol-jellerin ağ oluşumu için geçerli olan prensipler, silikat-olmayan inorganik alkoksitler için de geçerlidir. Gerçekte titanyum, zirkonyum, kalay ve alüminyumun metal alkoksitleri, suya karşı, alkoksilanlardan, düşük elektronegatiflikleri ve yüksek Lewis asitliklerinden dolayı daha reaktiftirler (Garcia ve Laino, 2005).

2.1.3. Sol-jel işleminin basamakları

Genel olarak sol-jel işlemini tanımlamak için üç reaksiyon kullanılır. Bunlar hidroliz, alkol kondenzasyonu ve su kondenzasyonudur. Su ve alkoksitlerin birbirine karışmama özelliklerinden dolayı, alkol ortak çözücü olarak kullanılmaktadır. Alkol fazlası sayesinde, sol-jel başlatıcı maddesi alkoksit ve su iyi bir şekilde karışır ve hidroliz kolaylaşır. Hidroliz reaksiyonu boyunca alkoksit gruplar (OR) hidroksil (OH) gruplarıyla yer değiştirir (Yang, 2005). Sonrasında kondenzasyon reaksiyonlarında silanol grupları (Si-OH) siloksan bağları oluşturur ve yan ürün olarak su veya alkol oluşur. Birçok koşul altında, kondenzasyon reaksiyonu hidroliz tamamlanmadan başlar. Ancak pH, H₂O/Si oranı R ve katalizör gibi faktörler değiştirilerek hidroliz reaksiyonunun, kondenzasyon başlamadan tamamlanması sağlanabilir (Keefer, 1990). Bunlara ek olarak, su ve alkoksitler birbirlerine karışmadığı için, ortak bir çözücü olarak uygun bir alkol kullanılır. Bu homojenleştirme reaktifi alkolün varlığında, alkoksit ve suyun karışabilmesinden dolayı hidroliz kolaylaştırılır (Prassas ve Hench, 1984). Siloksan bağları sayısının artmasıyla, tek tek monomerler birbirlerine oksijen köprüsüyle bağlanırlar ve sol çözeltisi içerisinde bir araya toplanırlar. Sol partikülleri bir araya toplandığında ya da bir başka ifadeyle birbirlerine sıkı sıkıya bağlandıklarında bir jel yapısı meydana gelir.

HİDROLİZ



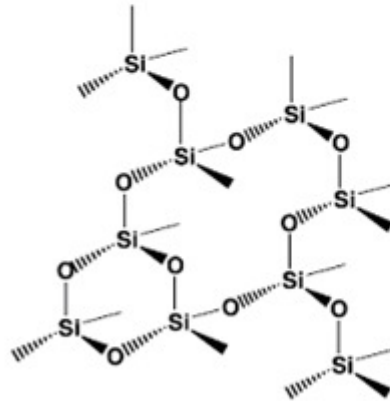
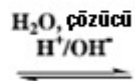
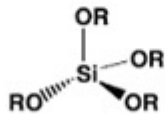
ALKOL KONDENZASYONU



SU KONDENZASYONU



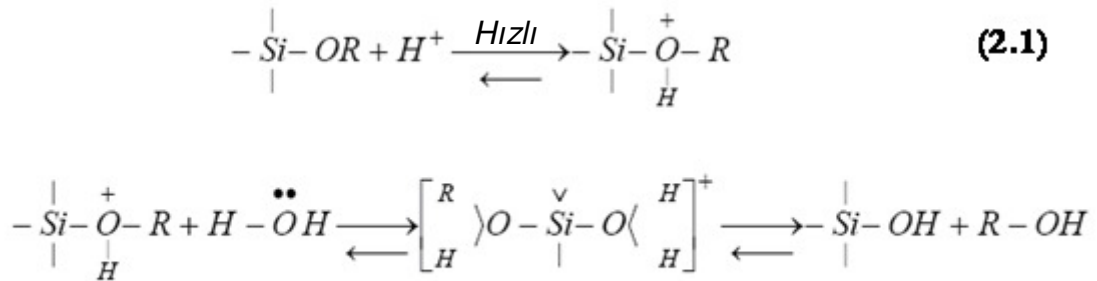
TOPLAM REAKSİYON



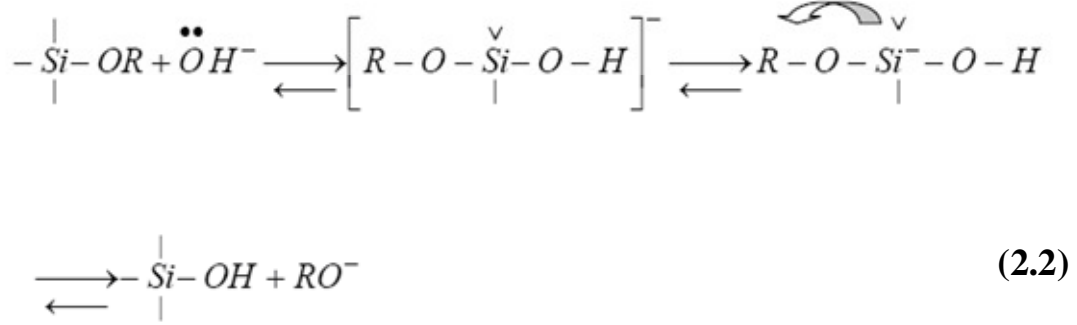
Şekil 2.2. Silisyum temelli sol-jel işleminin basamakları.

2.1.3.1. Hidroliz ve kondenzasyon

Hidroliz reaksiyonu katalizör kullanmadan gerçekleşebilmesine rağmen, asit ya da baz katalizi yardımıyla gerçekleşen hidroliz reaksiyonunun çok daha hızlı ve eksiksiz tamamlanabildiği gözlenmiştir. Hidroliz reaksiyonunun oranını etkileyen en büyük etken asit veya baz katalizidir. Hidroklorik asit ve amonyak en çok kullanılan katalizörlerdir ancak asetik asit, potasyum hidroksit, aminler, potasyum florür ve hidrojen florür gibi katalizörler de kullanılabilir (Brinker ve Scherer, 1990). Hidroliz reaksiyonunun hızı ve süresi, asit veya baz katalizörün kuvveti ve derişimine bağlıdır (Aelion ve ark., 1950). Genellikle zayıf asitlerin kullanımı, kuvvetli asitlerle kıyaslandığında daha uzun reaksiyon süresi gerektirir. Silisyum temelli alkoksitlerin baz katalizli hidrolizi ise eşdeğer derişimde asit katalizörle yapılacak hidroliz reaksiyonundan çok daha yavaş gerçekleşir (Xi ve ark., 1995). Asidik şartlar altında, alkoksit grubu hızla protonlanır. Bunun sonucu olarak silisyum atomunun elektron yoğunluğu azalır (elektronegatifliği artar), kısmi pozitif yüklü hale gelerek daha elektrofilik olur. Bu yüzden su gibi bir nükleofil atağına karşı hassas hale gelir yani su molekülü ile etkileşimi kolaylaşır. Bu basamakta gerçekleşen SN2 reaksiyonu tek basamaklı bir reaksiyondur ve ara ürün oluşmaz. Nükleofil grup (H₂O) merkez atoma (Si), ayrılan grubun (R-OH) karşı tarafından atak yapar. Geçiş hali, nükleofil (H₂O) ve Si atomu arasında bir bağ oluşurken, aynı zamanda Si atomu ve ayrılan grup arasındaki bağın kopması sırasında oluşur. Sonuç olarak geçiş hali Si-OHR bağının kopmasıyla bozulur ve silisyum konfigürasyonu Reaksiyon 2.1'deki hali alır. Reaksiyon 2.1:

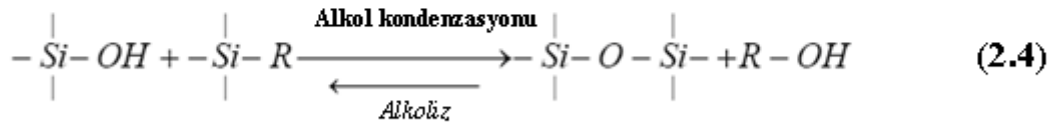
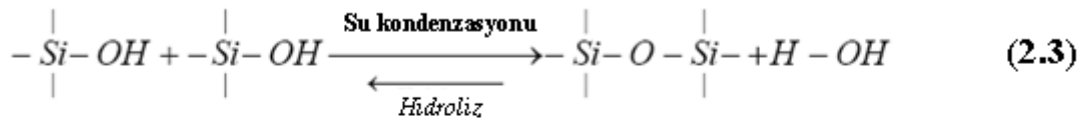


Bazik şartlar altında, hidroksil anyonu nükleofil olarak görev alır, silisyum atomuna atak yapar ve yine bir SN2 mekanizması gerçekleşir, OH grubu, OR grubuyla yer değiştirerek, silisyumun dörtyüzlü konfigürasyonu sağlanır. Reaksiyon 2.2 :



2.1.3.2. Jelleşme

Jelleşme basamağında, alkoksit başlatıcı, kondenzasyon polimerizasyonu reaksiyonuna uğrar ve yan ürün olarak da su ve alkol oluşur. Hidrolize benzer olarak, kondenzasyon reaksiyonunda asit / baz katalizinden etkilenir. Asit katalizörü varlığında lineer ya da zayıf çapraz bağlı polimerler oluşur. Düşük gözenekliliğe sahip küçük gözenekli (mikroporoz) bir yapı oluşur. Öte yandan, eğer baz katalizi kullanılırsa gruplanmış yapıda bulunan dallanmış kümeler oluşur. Jelleşmeden sonra mezoporoz bir yapı meydana gelir. Reaksiyon (2.3) ve (2.4):



2.1.3.3. Yaşlandırma

Jelleşmeden sonra yaşlandırma işlemi sırasında, meydana gelen kimyasal ve fiziksel değişiklikler çok önemlidir. Bu işlem sırasında, kovalent bağlanma noktaları bağlanmamış bölgelere temas eder, aynı zamanda ileri çapraz bağlanmalarda devam eder ve jel büzülür. Jel yapısında değişim meydana gelmesiyle gözenek büyüklüklerinde ve gözenek duvarlarının dayanıklılığında da değişiklikler meydana gelir.

2.1.3.4. Kurutma

Jel yapısının içerisinde üç boyutlu birbirine bağlanmış gözenekler bulunmaktadır ve yüksek oranda su içerirler. Yoğunlaşma işlemi esnasında gözenekler kapatılmadan önce, bu gözenekler içerisinde hapsedilmiş çözücü fazlasının kurutma işlemiyle uzaklaştırılmasına ihtiyaç vardır. Öte yandan, küçük gözeneklerden sıvıların uzaklaştırılması, homojen olmayan büzölmelerin sonucu olarak önemli gerilmelere neden olmaktadır. Burada temel problem jel yapısında meydana gelen kırılma ve çatlamalardır. Bu kırılmalar kapiler kuvvetlerden doğar. Jeldeki gözenek çapları çok küçük boyutlarda olduğundan, içerdikleri sıvının hidrostatik basıncı da o oranda yüksek olmaktadır. Bu durumda, kırılma probleminden kurtulabilmek için kurutma işlemi çok yavaş yapılmalıdır. Ayrıca küçük kesitler için, örneğin; toz, tabaka ve fiber gibi, kurutma gerilimleri daha küçüktür ve bu sol-jel yapılarında kırılmalar çok daha az görülür. Fakat 1 cm'den büyük monolitik nesneler için, kurutma gerilimleri çok çok büyüktür ve kırılmalar da çok fazla meydana gelir. Bu sorunun çözümü olarak da, alümina tozları dolgu maddesi olarak kullanılabilir. Sonuç olarak, işlemin her basamağının kimyasını kontrol etmek kırılma ve çatlamları engellemek için çok önemli ve gereklidir.

2.1.3.5. Yoğunlaşma

Oda sıcaklığında hazırlanan ve kurutulan silika sol-jellerinin birçok uygulaması olmasına rağmen, (özellikle fonksiyonel organik ve biyolojik moleküllerin jel içerisine hapsedilmesi, immobilizasyonu gibi) yüksek sıcaklıklara kadar jellerin ısıtılma işlemi, cam ve seramik malzeme üretiminde gereklidir. Jellerin çok yüksek

sıcaklıklarda tavlama işleminden sonra, gözenekler yok edilir ve sol-jel materyallerinin yoğunluğu, eriyik camın yoğunluğuna eşdeğer hale gelir. Yoğunlaşma sıcaklığı gözeneklerin boyutlarına, bağlanma derecelerine ve yapının yüzey alanına bağlıdır (Yang, 2005).

Sol-jelin ve kserojelin oluşumu esnasındaki kimyasal reaksiyonlar, sonuç materyalin özelliklerini ve bileşimini etkiler. Kuru jelin fiziksel özellikleri (ortalama gözenek büyüklüğü, gözenek çapı dağılımı, gözenek şekli, yüzey alanı...) sol-jel işleminin parametrelerine ve materyallerin hazırlanmasında kullanılan metodlara bağlıdır. Sol-jel işlemi, fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında literatürde yayınlanmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Hench ve West, 1990; Collinson, 1999).

Önceden öngörülen (tailor-made, ısmarlama) gözenek büyüklüğü ve şekline sahip materyaller, moleküler tanıma ihtiyacı duyulan ayırmalar, adsorpsiyon, kataliz, ilaç salınımı ve kimyasal sensör uygulamalarındaki potansiyellerinden dolayı ilgi çekmektedirler. Bugüne kadar amorf metal oksit sol-jel materyallerinin, kimyasal uygulamalarda akrilik bazlı damgalanmış polimerler kadar başarılı olduğu kanıtlanamamıştır. Ancak sol-jel materyallerin, polimerlere göre birçok avantajı bulunur. Örneğin, polimerlerin ısısal kararlılıkları, sol-jellerle kıyaslanamayacak kadar düşüktür. Sol-jellerde, kalınlığın, gözenekliliğinin ve yüzey alanının kontrolü kolaydır, seçicilik ve difüzyonda akrilik-bazlı polimerlerden daha iyidir (Marx ve Liron, 2001; Lahav ve ark., 2001).

Sol-jel türevi materyaller, kimyasal ve malzeme özellikleri bakımından incelendiğinde, diğer maddelerle ulaşılması çok zor olan özelliklerin bileşimini içerir. Sol-jellerin benzersiz ılımlı sıcaklıklar ve şartlarda işlem koşulları vardır ve sol-jel türevi materyaller kolaylıkla sentezlenebilir, modifiye edilebilir, çok saf bir şekilde elde edilebilirler. Aynı zamanda organik/inorganik hibrit materyallerin kompozisyonları iyi bir şekilde kontrol edilebilir. Çeşitli yapılardaki materyaller (monolitler, tozlar ve monodispersler, filmler, fiberler) kimyasal analizlerde ve katalizde kullanılmak üzere sentezlenebilir. Aktif filmler ve ince tabakalar, kısa difüzyon yolları nedeniyle, sensör olarak en çok kullanılan biçimlerdir. Reaktifler, kararlı bir matriks içerisine kolaylıkla dahil edilebilir (sol'un jelleşmesi sırasında). Sol-jeller, pH indikatörleri, boyalar ve enzimler gibi moleküler tanıma elementlerini

kolayca hapsedebilmelerinden dolayı, kimyasal sensörlerin geliştirilmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Sol-jel materyaller katıdır, optik olarak saydamdır ve elektro-, foto- ve kimyasal olarak kararlıdır.

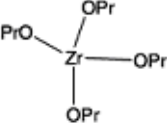
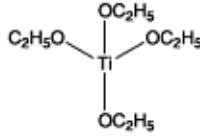
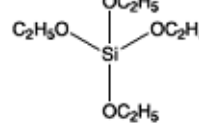
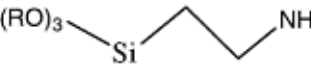
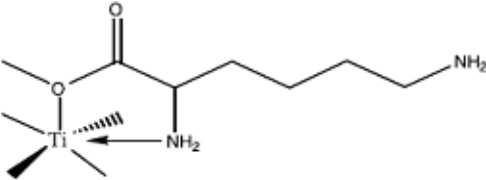
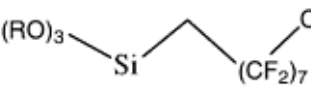
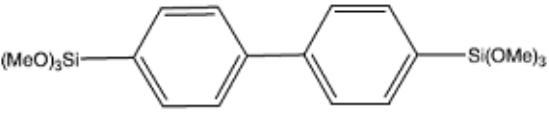
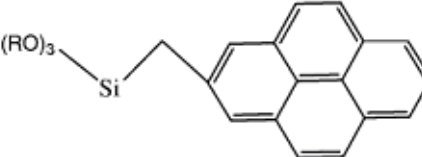
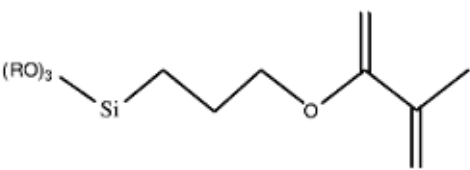
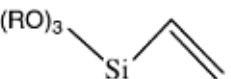
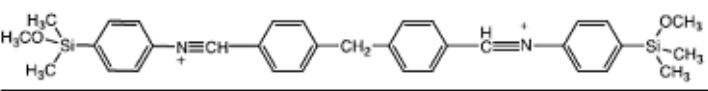
Sol-jel işleminde en çok, silika, metalosilikatlar, titanyum, zirkonyum ve alüminyum oksit üzerine odaklanılmıştır. Bu materyaller birçok uygulama alanı için uygun olmasına rağmen, gözeneklilikleri sınırlıdır ve kimyasal fonksiyonlarının değiştirilebilmesinde eksiklikler vardır. Sol-jel işleminin en önemli avantajı ve gelişimlerinden biri de, inorganik/organik hibrit materyallerinin sentezinin mümkün olmasıdır. Bu tür malzemeler, inorganik ve organik bileşenlerinin özelliklerini tek bir madde içerisinde birleştiren malzemelerdir. Sol-jel işlemi ile yapılan inorganik/organik hibrit materyalleri, ormosiller (organik olarak modifiye edilmiş silikatlar), ormoserler (organik olarak modifiye edilmiş seramikler), poliseramlar (polimerik seramikler) olarak adlandırılırlar. Böylece, başlatıcıların kimyasal bileşimlerdeki çeşitlilik ve inorganik/organik bileşenlerin oranlarındaki değişikliklerle, malzemelerin özellikleri çok geniş bir aralıkta değişiklik gösterir. Çizelge 2.1’de bazı başlatıcılar ve hibrit materyaller gösterilmektedir.

2.1.4. Enzim immobilizasyonu

Enzimler, canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları düzenleyen biyolojik katalizatörlerdir. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmemiş karıştlarına göre 10^7 - 10^{16} kez daha hızlı gerçekleşirler. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Enzimler ılımlı koşullarda (pH 7.0, oda sıcaklığı) çalıştığı için reaksiyon maliyetini düşürürler ve çevresel sorunlar yaratmazlar. Yeterli koşulların sağlanması koşuluyla etkilerini doğal ortamlarının dışında da gösterebiliyor olmaları, enzimlerden pek çok alanda yararlanabilme imkanı vermektedir. Pekçok endüstriyel, analitik ve klinik işlemlerde enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılırlar ve ürüne dönüştürüldükten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük değer kayıplarına neden olmaktadır. Bu nedenle immobilize olarak tekrarlanabilir bir şekilde kullanılmaları ekonomik olarak daha uygun olmakla birlikte, enzimatik işlemler de

sürekli olarak yapılabilmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1. Sol-Jel işlemi kullanılarak, inorganik-organik hibrit materyallerin hazırlanması için kullanılan bazı metal alkoksit başlatıcılar.

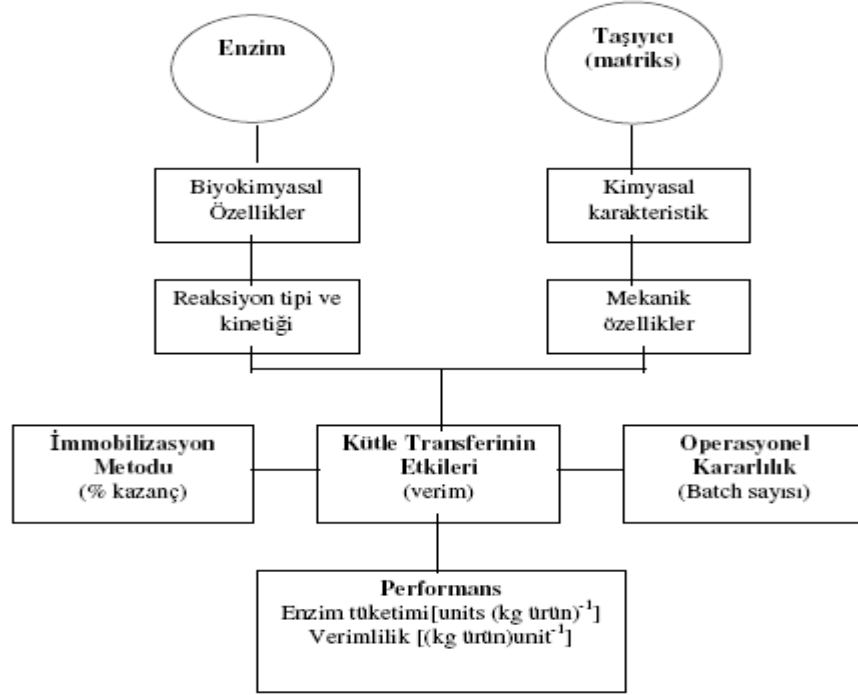
Metal oksit	Acıklamalar
  	Metal Alkoksitler Tetrapropil zirkonat Tetraetil orto silikat Tetraetil orto titanat
	Hidrofilik başlatıcı
	Titanyum temelli Hidrofilik başlatıcı
	Hidrofobik başlatıcı
	Önceden organik olarak bağlanmış başlatıcı
	Floresan başlatıcı
	Polimerleşebilir başlatıcı
	Çapraz bağlayıcı
	

Enzim immobilizasyonunun başlıca avantajları şunlardır:

- Enzimin katalitik gücü kaydadeğer ölçüde kararlı kılınmış olur.
- Kolaylıkla tekrar tekrar kullanılabilir.
- Ürünler saf olarak kolaylıkla elde edilebilir.

- Sürekli üretim yapılabilir.
- İşlem süresi kısaltılabilir.
- Üretim maliyeti düşürülebilir.

İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzim hem de taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır. Bu ikisi ile immobilize enzim kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler kazanır. Şekil 2.3'de de görülen bu özellikler immobilize enzimin verimini etkiler (Uludağ, 2000; Yener, 2007).



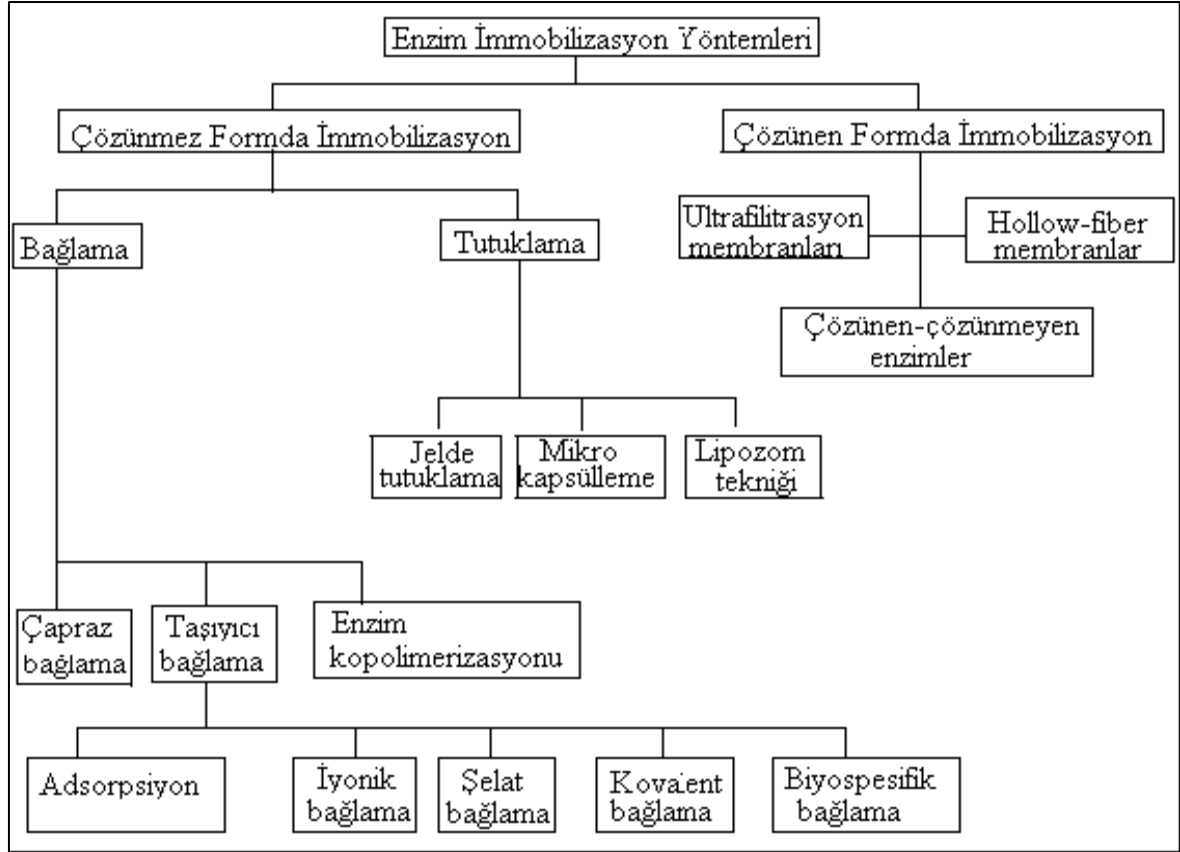
Şekil 2.3. Enzim ve matriksin etkileşimi ile ortaya çıkan immobilize enzimin özellikleri.

İmmobilize enzimin verimi hem bağlanma sırasında olan kayıplardan dolayı hemde enzim moleküllerinin gözeneklerden yavaş yavaş sızması ile azalır. Bu olumsuzluklar verimi düşürür. Reaksiyon verimini artırmak için yapılabilecek işlemler şunlardır (Tischer ve Kasche, 1999):

- Taşıyıcının tanecik boyutlarını düşürmek
- Yüksek özgün aktivitesi olan enzimlerde, enzim yükleme miktarını azaltmak
- Enzimi taşıyıcı materyalin dış yüzeyine bağlamak

Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber Şekil 2.4’de verildiği gibi sınıflandırmak da mümkündür (Telefoncu, 1997).



Şekil 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.

Enzim immobilizasyon yöntemleri;

Çözünmez formda immobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

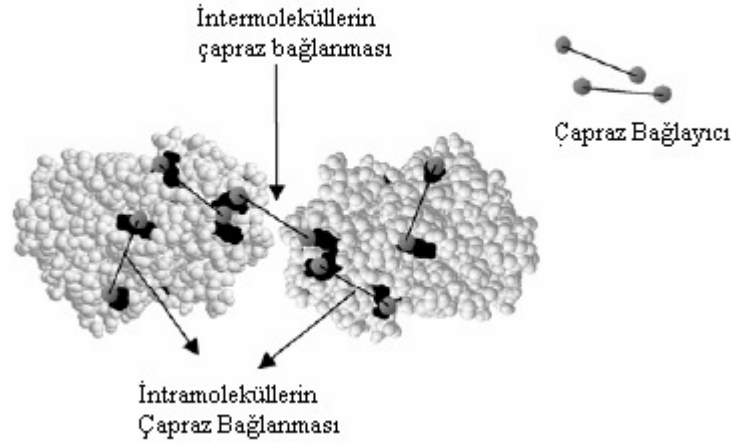
2.1.4.1. Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri de *bağlama* ve *tutuklama* olarak ikiye ayrılmaktadır.

A. Bağlama

Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Çapraz bağlama; Küçük molekülü iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında çapraz bağlar yapmaktadırlar (Chibata, 1978).



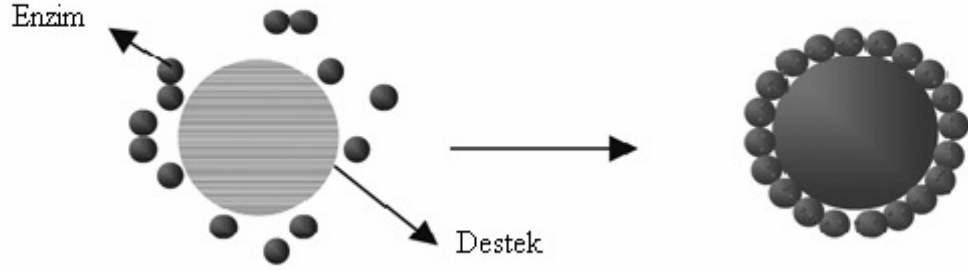
Şekil 2.5. Çapraz bağlama ile immobilizasyon.

Enzim kopolimerizasyonu; Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır.

Taşıyıcıya bağlama; Adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olarak beş gruba ayrılmaktadır.

1. *Adsorpsiyon*; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, CaCO_3 , nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkılarak ortamdan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916).

2. *İyonik bağlama*; İyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır (Wang, 1993).

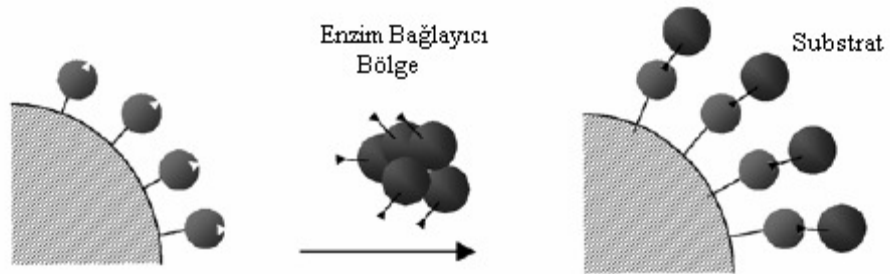


Şekil 2.6. Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması.

3.Şelat bağlama; Bu yöntemde, bazı geçiş metallerinin (Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır (Kennedy ve ark., 1983).

4.Kovalent bağlama; Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir (Zaborsky, 1973).

5.Biyospesifik bağlama; Bu yöntemde, enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimlerden yararlanarak enzimler immobilize edilmektedirler (Telefoncu, 1997).



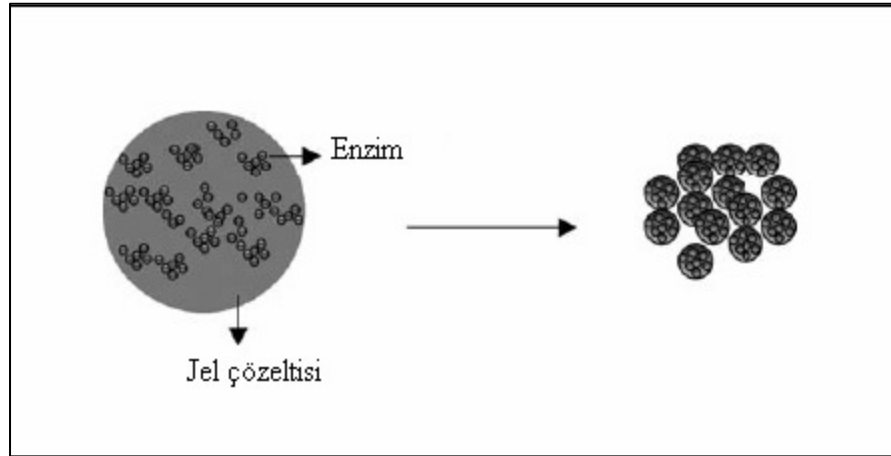
Şekil 2.7. Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi.

B. Tutuklama

Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir ortamda durmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir (Telefoncu, 1997).

Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olarak üçe ayrılmaktadır.

1) Polimer matrikse tutuklama yöntemi; Bu yöntem, polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzimin de bulunması durumunda çapraz bağlanma sonucu oluşan kafeslerde enzimin tutulması esasına dayanmaktadır (Cremonesi ve Angiuro, 1983).



Şekil 2.8. Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu.

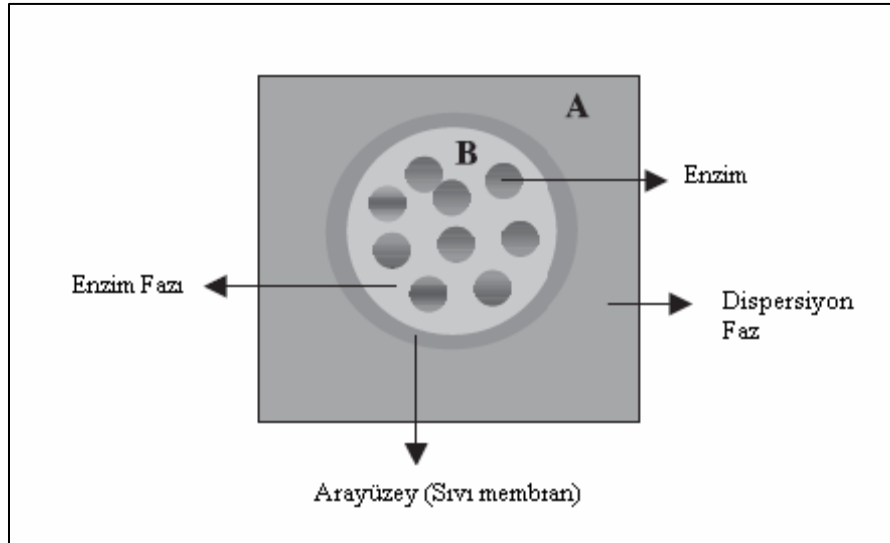
2) Mikrokapsülleme; Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanmaktadır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 µm arasında değişmektedir. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır (Chang, 1976).

3) Lipozom tekniği; Bu yöntem, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır. Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir. Oldukça

büyük bir temas yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlamaktadır. Bunların yanında, substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin aktivite kaybetmesi ve sıvı olan membrandan enzim kaçma olasılığı bulunmaktadır (Luisi ve Magid, 1986).

2.1.4.2. Çözünür formda immobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir. Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmemektedir. Fakat substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında kısıtlamalara rastlanmaktadır. Bu nedenle küçük moleküllü substrata sahip olan enzimlerin bu yöntemle immobilize edilmesi tercih edilebilir (Wichmann ve ark., 1981; Alagöz, 2007).



Şekil 2.9. Çözünür formda immobilizasyon.

2.1.5. Sol-jel yöntemiyle biyomoleküllerin immobilizasyonu

Son 40 yıldır, biyoimmobilizasyonun gelişimi, seçici ekstraksiyon, salınım, ayırma, reaktiflerin dönüşümü ve belirlenmesi için biyomoleküllerin kullanımında bir devrim niteliği taşımaktadır. Proteinler, peptitler, nükleik asitler ve hücreler gibi biyolojik türlerin çeşitli uygulamalarda kullanılmak üzere, uygun bir yüzeye başarılı bir şekilde immobilizasyonu konusunda çok önemli çalışmalar yapılmıştır. Immobilizasyon sonrasında sentezlenen yapının kullanışlı olması için, yüksek miktarda biyomolekül immobilize edilebilmeli, immobilize edilen molekül aktivitesini kaybetmemeli, kararlılığını uzun süreli korumalı, analit molekülleriyle etkileşimi iyi ve hızlı olmalı ve desorpsiyona karşı dirençli olmalıdır.

Biyomoleküllerin inorganik, organik veya polimerik yüzeylere immobilizasyonunda çok çeşitli tekniklerin kullanılabildiği görülmektedir. Ancak bu teknikler, genel geçerliliği olan teknikler değildir yani birçok durumda yalnızca sınırlı aralıkta biyomoleküller veya uygulamalar için kullanılabilirler. Dahası, biyomoleküllerin desorpsiyonu, başlangıçta ve uzun vadede denatüre olmaları ve biyomoleküllerin yönelimlerinin kontrolünün zorluğu çok karşılaşılan problemlerdir. Bu sebeplerden dolayı, yeni bir biyolojik tür kullanıldığı zaman, immobilizasyon protokolünün her defasında optimize edilip, en uygun şartların bulunması gerekir ve bu da uzun zaman kaybına ve iş yoğunluğuna neden olur (Jin ve Brennan, 2002).

Son yıllarda biyoimmobilizasyon çalışmaları için ortaya çıkan yeni bir yol da, biyolojik bileşenlerin düşük sıcaklıkta gerçekleşen sol-jel metoduyla oluşturulan inorganik silikat matrislerine tutuklanması işlemidir (Braun ve ark., 1992, 1990; Avnir ve ark., 1994; Livage ve ark., 1996). Sol-jel işlemi yaklaşık yüz yıldır cam ve seramik yapımında iyi bilinen bir yöntemdir (Ebelman, 1846). Ancak 1950'lerin ortalarına kadar biyomoleküllerin silika yapısına immobilizasyonu ile ilgili çalışma yapılmamıştır. Bu tarihte, Dickey birçok enzimin, silisik asit türevi camlara biyolojik aktivitelerini kısmen koruyarak hapsedilebileceğini gösterdi (Dickey, 1955). Ne yazık ki, bu buluşun önemi o dönemde pek fazla anlaşılamamış ve sol-jel türevi biyomateryallerin gelişimi 30 yıl daha ertelenmiştir. 1990'da Avnir ve çalışma arkadaşları, proteinlerin sol-jel metoduyla sentezlenen alkoksisilan türevi silikatlara immobilizasyonu ve tutuklanmasını açıklayan, çok önemli anahtar bir makale yayınladı (Braun ve ark., 1990). Bu çalışmada, aspartaz ve alkalik fosfataz

enzimlerini de içeren bir enzim serisinin, tetraetilortosilikat (TEOS) türevi sol-jellere, enzimatik aktivitelerini kaybetmeden tutuklanabildikleri gösterildi. Bu çalışmayı takiben, 1992'de Zink'in grubu, tetrametilortosilikat (TMOS) türevi silikatlara, sitokrom C ve miyoglobulin gibi proteinleri, O₂ bağlama kabiliyetlerini kaybetmeden tutuklamayı başardı (Ellerby ve ark., 1992). O zamandan beri çalışmaların büyük bir kısmını, geniş bir çeşitlilikte enzimler, antibadiler, düzenleyici proteinler, membran proteinleri, nükleik asitler gibi biyolojik türlerin çok çeşitli sol-jel kompozit materyaller içerisine tutuklanmasını tanımlayan ve açıklayan çalışmalar yapmıştır (Livage ve ark., 2001; Gill ve Ballesteros, 2000). Canlı hücrelerin, sol-jel türevi camlara tutuklanması çalışması, Livage tarafından yayınlanmıştır.

Sol-jellere biyomolekül tutuklanması özellikle son 10 yıldır dikkati çeken bir alan olmuştur (Mackenzie, 2003; Sakka, 2003). Bu metod kullanılarak, biyomateriyaller oda sıcaklığında üretilebilir ve jelleşme asit veya bazlarla katalizlenebilir, hassas biyolojik türler için iyi ayarlanmış şartlar kolayca elde edilebilir (Avnir ve ark., 1994).

Sol-jel tekniği kullanılarak biyomoleküllerin tutuklanması, bugüne kadar çoğunlukla tek bir tür biyomolekül ve genellikle de enzim kullanılarak yapılmıştır. Aynı materyal içerisine eşzamanlı olarak birden fazla ve farklı enzimin immobilizasyonu da mümkündür (Wei ve ark., 2002; Park ve Clark, 2002). Bu şekilde birden fazla enzimin immobilizasyonu, biyokatalizör uygulamalarında avantajlar sağlayabilir. Ayrıca sol-jel materyalleri, bakteriler (Branyik and Kuncova, 2000; Peralta-Perez ve ark., 2001; Coiffier ve ark., 2001; Nassif ve ark., 2002), hayvan hücreleri (Sglavo ve ark., 1999) ve bitki hücreleri (Carturan ve ark., 1998) gibi her türlü biyolojik molekülü immobilize etmek için de kullanılır (Rodgers, 2006).

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan da görüldüğü gibi sol-jeller biyokimyasal uygulamalarda büyük avantajlar sağlamaktadırlar. Sol-jel türevi silikat materyallerinin, protein immobilizasyonunda sağladığı temel avantajlar ise aşağıdaki gibi sıralanabilir:

a) Sol-jeller, optikçe geçirgen yapılabilirler ve bu da onları, kimyasal ve biyokimyasal sensörlerin geliştirilmesi çalışmaları için ideal yapar.

b) Çok çeşitli kimyasal modifikasyonlara açıktırlar. Çeşitli polimer katkı maddeleri, redoks modifiye ediciler, organik katkı maddeleri, organik olarak modifiye edilmiş silanların katılmasıyla, elektriksel iletkenliğe sahip malzemeler üretilebilir ve bu materyaller elektrokimyasal sensör olarak kullanılabilir.

c) Gözenek büyüklükleri ve dağılımları kolayca ayarlanabilir. Büyük moleküllerin gözenekler içerisinde tutuklanmaları sağlanırken, küçük moleküller ve iyonların matriks içerisine difüzyonu gerçekleştirilebilir ve bu da moleküler büyüklüğe bağlı biyoanaliz çalışmalarında kullanılabilir.

Literatür çalışmalarına bakıldığında, çeşitli proteinlerin ve biyolojik türlerin, geniş bir aralıkta ve çeşitlilikte sol-jel türevi nanokompozit materyaller içerisine tutuklanmaları ve bunların biyosensör, biyokatalizör olarak kullanımları konusunda örnek bir çalışma Gill tarafından yayınlanmıştır (Gill, 2001). Bu tür çalışmalarda, biyolojik molekül tutuklanmış sol-jel materyalleri için, protein-matriks ve analit-matriks etkileşimlerinin doğası konformasyonları, faydalanabilirliği ve aktivitesi, tutuklanmış proteinlerin kararlılığı ve reaksiyon kinetikleri gibi çok önemli parametreler üzerinde yoğunlaşıp, temel bir anlayış geliştirmeye çalışılmıştır. Biyokompozit materyallerin, biyosensörlerin geliştirilmesinde, afinite kromatografisinde durgun faz olarak, immünoadsorban ve katı-faz mikroekstraksiyon kaplamalarda, kontrollü salınım ajanları ve katı-faz biyokatalizörler gibi çok çeşitli alanlarda kullanımları vardır.

2.1.5.1. Sol-jel işlemiyle proteinlerin tutuklanması

Biyolojik molekül tutuklanmış materyallerin sol-jel işlemiyle hazırlanmasında, birçok parametreyi aynı anda ve işlem sırasında sürekli kontrol etmek gerekir.

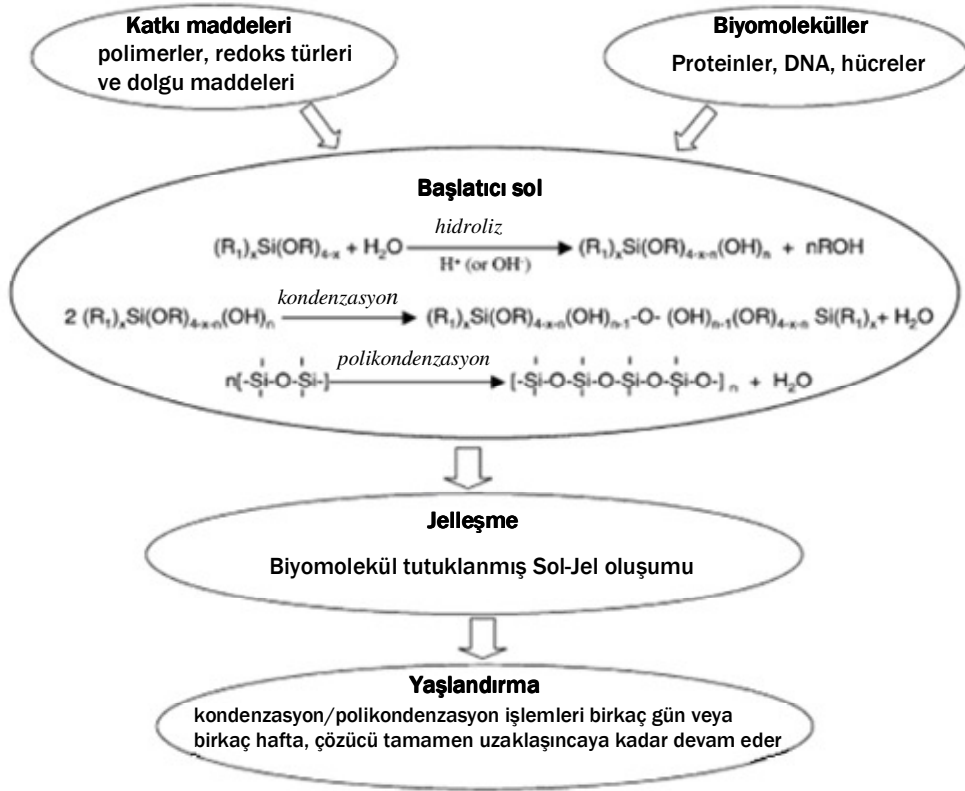
1. Geliştirilen işlemin, biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarını kaybetmemelerini sağlayacak şekilde, ılımlı şartlarda gerçekleştirilmesi gerekir.

2. Polimerizasyon reaksiyonu, protein fonksiyonu için gerekli pH ve iyonik kuvvet aralıklarıyla uyumlu olmalıdır.

3. İşlem, proteinlerin doğal konformasyonlarını sürdürmeleri için, oda sıcaklığında veya yakınında gerçekleşmelidir.

4. Sentezlenen sol-jelin gözenek büyüklüğü, immobilize edilecek moleküle uygun olacak şekilde, çok küçük ya da çok büyük olmamalıdır.
5. Materyal özellikleri, modifikasyonlarda hesaba katılarak ayarlanabilir olmalıdır ve sol-jelin çeşitli özellikleri modifiye edilerek, tutuklanan biyomolekülün aktivitesini en üst düzeye çıkartması amaçlanmalıdır.
6. Elde edilen ürün sensör uygulamalarında kullanılacağı zaman, spektroskopik veya elektrokimyasal ölçümlerin yapılabilmesi için, optikçe geçirgen veya elektriksel iletkenliğe sahip olmalıdır.
7. Materyalin üretim tekniği açık ve anlaşılır, yeniden üretilebilir olmalıdır. Ve çeşitli formlardaki malzemeleri örneğin; camlar, ince filmler, kolonlar, fiberler ve toz yapılar gibi formlarda üretim yapabilmeye uygun olmalıdır.

Bu amaçlar doğrultusunda, sol-jel türevi biyokompozitler genel olarak Şekil 2.10'daki tabloya göre üretilirler. Materyalin oluşumu, uygun bir başlatıcının, sol çözeltisini oluşturmak için hidrolize olmasıyla başlar. Tetraalkoksisilanlar, mono-di- veya tri-alkil alkoksisilanlar, veya alkenil, aril, amino, karboksil, tiol gibi fonksiyonel grup içeren maddeler, flavinler veya kuinonlar başlatıcı maddelere örnek verilebilir. Bunların yanı sıra Al, Ti, V veya Ce gibi diğer metal merkezler de, materyalin özelliklerini değiştirmek için kullanılabilirler. Hidroliz reaksiyonu asit veya baz kataliziyle de gerçekleştirilebilirken, çeşitli katkı maddeleri eklenmesiyle transesterleşme reaksiyonu da sağlanabilir. Örneğin gliserin gibi bir katkı maddesi eklenerek, tipik alkoksisilanlardan daha biyoyumlu olan poli(gliseril silikatlar) elde edilebilir (Gill, 2001).



Şekil 2.10. Sol-Jel türevi biyokompozitlerin üretimi.

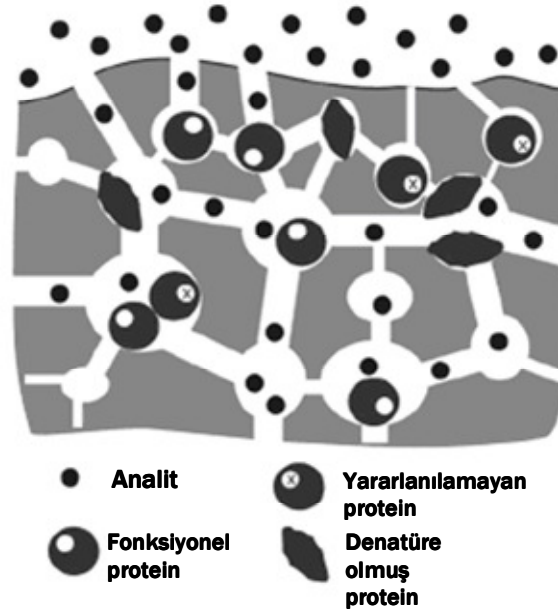
Hidroliz olmuş başlatıcı daha sonra, tampon içerisindeki biyomolekül çözeltisiyle karıştırılır. Bu aşamada, çözeltiliye sonuç materyalini istenilen özelliklerde üretebilmek için, kurutma kontrolünü sağlayacak katkı maddeleri, polimerler, redoks türleri ve dolgu maddeleri eklenebilir. Eklenen tuzların fazlalığıyla pH'daki değişim ve katalizörler polimerizasyon derecesini artırır, sol çözeltisi jelleşmeye başlar ve biyomolekül bu ağ yapısı içerisine tutuklanır. Başlangıçta oluşan jel yumuşaktır ve yüksek miktarda su içerir (%50-80) ve gözenekler büyüktür (çapı 200 nm'den büyük). Bu ıslak jelin yaşlandırma işlemi, birkaç günden, birkaç haftaya çıkabilen bir zamanı kapsar. Bu işlem sonrası jel %10-30'u kadar büzülür, gözeneklerin çapları yaklaşık %25'i kadar küçülür ve siloksan gruplarının silanol gruplarına karşı kısmi oranı artar (Brinker ve Scherer, 1990). Sonuç olarak, yaşlandırılmış materyal kısmen kurumuş olur. Sonrasında yapılan kurutma işlemiyle de, yapı içerisindeki su tamamen giderilir, ileri çapraz bağlanmalar tamamlanır, gözenek çapları, 2-20 nm aralığına kadar küçülür ve materyalde toplamda başlangıçtaki hacminin yaklaşık %85'i kadar büzülme meydana gelir.

Sonuçta elde edilen hidrojel veya kserojel materyali, nano veya mikro boyutta oksijen köprülerine sahiptir ve biyolojik türler fiziksel olarak bu ağ yapısı içerisinde tutuklanırlar (Hüsing ve Schubert, 1998). Membran kısımları ve hücreler gibi (bu biyomoleküller ağ gözeneklerinden daha büyüktür) mikrometre boyutunda olan biyolojik moleküllerin alıkonma mekanizmalarını tasarlamak kolay olmasına rağmen, büyüklükleri sol-jel gözenek büyüklüklerine yakın ya da daha küçük olan biyomoleküllerin tutuklanmasını sağlamak çok daha zordur. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar göstermiştir ki, başlatıcı türüne ve kullanılan protokole bağlı olarak, moleküler ağırlıkları 8000 ile 15000 arasında olan (~1.3 – 1.7 elipsoid yapıda) proteinler tersinmez bir şekilde sol-jeller içerisine tutuklanabilmektedir (Shtelzer ve ark., 1992; Gill ve Ballesteros, 1998).

2.1.5.2. Tutuklanmış proteinlerin yararlanılabilirliği

Proteinlerin sol-jel matriksler içerisine tutuklanmasıyla, oldukça duyarlı, hızlı ve yararlı biyoanalitik uygulamalarda kullanılabilecek biyomateryaller üretilir. Ancak bu işlemde, biyomoleküllerin nanometre boyutlarındaki gözeneklere tutuklanması bazı olumsuzlukları beraberinde getirir (Şekil 2.11). Bu duruma göre tutuklanan proteinlerden bazıları, tamamen yararlanılabilir formda yani bir başka analit molekülüyle etkileşime girebilecek durumda tutuklanır. Bazıları ise gözenekler içine, yararlanılamayacak, biyolojik aktivitelerini sürdüremeyecekleri bir formda tutuklanırlar (Jin ve Brennan, 2002).

Tutuklanan biyomolekülün yararlanılabilirliği, gözenek büyüklüğü ve materyalin elektrostatik özellikleri ayarlanılarak büyük oranda belirlenebilir. Uygun başlatıcılar seçilerek, sol-jel sentez şartları, silisyum:çözücü oranı, yaşlandırma koşulları ve bunun gibi parametreler en doğru şekilde ayarlanarak biyomoleküllerin yararlanılabilirliği artırılabilir. Ayrıca elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi analit-matriks etkileşimleri de yararlanılabilirliğin belirlenmesinde önemli rol oynar. Sol-jel materyali ve biyomoleküller arasındaki çekme-itme kuvvetleri ve etkileşimlerine bağlı olarak, sol-jel matriks, analit molekülünü kısmen veya aşırı bir şekilde tutar (Shen ve Kostić, 1997; Badjiç ve Kostić, 2000).



Şekil 2.11. Sol-Jel türevi materyallere tutuklanan proteinlerin, mümkün olan tutuklanmış formları.

2.1.5.3. Sol-jel başlatıcı türleri ve matriks

Biyo-enkapsülleme ve biyo-tutuklama çalışmalarının çoğu, silisyum, metalosilikatlar ve titanyum, zirkonyum ve alüminyum oksitler üzerine odaklanmıştır (Li ve ark., 1998; Wang ve ark., 1999). Bu materyaller ultraviyole ve görünür bölge ışınlarını geçirdiklerinden dolayı optik sensörler için çok uygun olmalarına rağmen, kırılgenlikleri, sınırlı gözeneklilikleri ve kimyasal modifikasyonlara kapalı olmaları, uygulama alanlarını sınırlar.

Sol-jel kimyası ile biyolojik fonksiyonların birleştirilmesi konusunda çok fazla sayıda çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar sonucunda proteinler, antibadiler, antijenler, polinükleik asitler, bitki ve hayvan hücreleri gibi çok çeşitli türlerin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların temeli, optik ve elektrokimyasal biyosensörler ile biyokatalizörler üzerine odaklanmıştır (Lin ve Brown, 1997).

Biyolojik fonksiyonların belirlenmesi konusundaki çalışmalar, sol-jel üretim tekniklerindeki çeşitlilik ile birlikte, monolitik, ince film gaz ve sıvı-faz sensörleri gibi

çok çeşitli materyallerin yapılmasına imkan vermiştir. Bu sensörler, azotmonoksit, glikoz, üre, laktat, asetilkolin, alkoller ve organofosfatlar gibi çok fazla sayıda medikal ve çevresel analit molekülleri için kullanılmıştır. Bu sol-jel biyosensör uygulamalarının çok yönlülüğüne literatürden birçok örnek verilebilir. Fotoaktif fikobili-proteinler ve bakteriyorodopsin, spesifik enzimler ile birlikte tutuklanarak optik sensör elde edilmiştir (Pandey ve ark., 1996; Weetall, 1994). Tekniğin ılımlı koşullarda gerçekleştirilebildiği, bakteriyel patojenler ve protozoan parazitlerin tutuklandığı silika yapısının, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) yönteminde başarılı bir şekilde kullanılmasından bellidir (Barreau, 1994; Livage ve ark., 1996).

Diğer bir temel potansiyel uygulama ise, biyosensörler ile kıyaslandığında çok daha başarılı çalışmalar olmasına rağmen, oldukça yavaş bir ilerleme kaydedilen immobilize biyokatalizörlerdir (Avnir ve Braun, 1996). Gerçekte bugüne kadar bu alandaki çalışmalar tripsin ve alkalın fosfatazın immobilize edildiği model sistemler ile sınırlı kalmıştır. Ancak Reetz ve arkadaşları, lipazların ormosiller içerisine tutuklanması çalışmalarıyla, sol-jel immobilize biyokatalizörlerin çok önemli ve pratik faydalarını vurgulamışlardır (Reetz, 1997, 1996, 1995).

Silikat ve siloksan gliserin esterlerinin geliştirilmesi ve çeşitli proteinlerin immobilizasyonun da başlatıcı madde olarak kullanılması, sol-jel biyotutuklama uygulamalarında çok yararlı olmuştur (Gill ve Ballesteros, 1998). Bu metot, çok ılımlı şartlarda etkili tutuklama işleminin gerçekleştirilmesine, yaşlandırma işlemindeki kırılma etkilerinin azaltılmasına ve çok geniş bir aralıkta silikatlar, metalosilikatlar, ormosiller, fonksiyonel-siloksan ve hibrid sol-jel polimerler gibi materyallere immobilizasyonun yapılmasına olanak sağlamıştır. Biyomolekül tutuklanmış sol-jel uygulamaları kısmen az olmasına rağmen, bu teknik çok önemli faydalar sağlamaktadır. Yüksek immobilizasyon etkinliği, denaturasyona karşı yüksek direnç, tutuklanan biyomoleküllerin dış şartlara ve işlem koşullarına karşı artan kararlılıkları yöntemin getirdiği çok büyük avantajlardır (Obert ve Dave, 1999; Shabat, 1997). Canlı bakteriler, mantar ve bitki hücreleri biyodönüşüm ve ikincil-metabolit üretimi çalışmalarında kullanılmak üzere, silika ve ormosil sol-jellere çok başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir (Gill ve Ballesteros, 1998; Kaufmann ve Mandelbaum, 1996; Carturan, 1999).

Sol-jel biyo-katalizörlerin en güçlü kullanım alanlarından biri de, çoklu enzim sistemlerinin tutuklanmasıdır. Bu şekilde çoklu enzim sistemlerinin bir ağ yapısı içerisine hapsedilmesiyle, katalizleyecekleri reaksiyonlarda toplam etkinlikleri ve verimleri artar. Literatürde bu konuyla ilgili değişik çalışmalar görülmektedir. Siyalikasit aldolaz, miyokinaz, piruvatkinaz, pirofosfataz CMP-siyalatsintaz ve (2,6)-sialiltransferaz çoklu enzim sistemi, sürekli (2,6)-sialil-asetilaktosamin sentezini gerçekleştirmek için poli(3-aminopropilsiloksan)-zirkano silikat içerisine tutuklanmıştır (Gill ve Ballesteros, 1998). Ayrıca bir başka çalışmada, formatdehidrojenaz, formaldehitdehidrojenaz ve alkoldehidrojenaz silika içerisine birlikte tutuklanmış ve karbondioksitin metanole dönüşümü çok yüksek bir verimle gerçekleştirilmiştir (Obert ve Dave, 1999).

Sol-jellerin biyo-sensör ve biyo-katalizör uygulamalarına ek olarak, birçok kullanımları daha sıralanabilir. Fikobiliproteinlerin ve bakteriorodopsinin fotoaktiviteleri sol-jeller içerisinde de korunur ve böylece katı-faz biyo-dönüştürücüler ve biyo-optik depolama aygıtları üretilebilir (Chen, 1996). Silika sol-jellerinin biyo-uyumluluk özelliklerinin çok üstün olmasından yararlanılarak, memeli hücreleri immobilizasyonu gerçekleştirebilmiştir. Bu çalışmalarda; sığır karaciğer hepatositleri, cenin ve yetişkin farelerden alınan pankreatik kısımlar ve dopamin-salgılayıcı tavşan adrenal hücreleri immobilize edilmiştir (Pandey, 1996). Sol-jel içerisine tutuklanmış odacıkların başarılı bir şekilde diabetik bir fareye nakli (transplantasyonu) gerçekleştirilmiş, hayatta kalabildiği ve birkaç hafta boyunca ters bir etki meydana gelmeden insülin salgılayabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, biyo-immobilize sol-jeller kullanılarak yapay organların üretilebileceğini göstermiştir (Pope ve ark., 1995).

Sol-jel biyo-tutuklama çalışmaları eşsiz avantajlar sağlamaktadır (Çizelge 2.2.). Ancak, araştırmalar bazı önemli engelleri ve yetersizlikleri de ortaya çıkarmıştır. İlk olarak, daha biyo-uyumlu başlatıcılara ve protokollere ihtiyaç duyulmaktadır. Bugüne kadar polimerizasyon işlemleri, yüksek miktarda alkol içeren sol çözeltileriyle yapılmıştır. Tutuklama işlemlerinde, biyomoleküllerde meydana gelen denatürasyon ve aktivite kaybı problemleri bu nedenden kaynaklanmaktadır. Düşük alkollü protokoller ve poli(gliseroksisiloksan) başlatıcılar kullanılarak yapılan çalışmalar, en duyarlı biyomoleküllerin bile immobilize edilebildiğini ve

immobilizasyon etkinliğinin %99'lara kadar çıkabildiğini göstermiştir (Avnir ve Braun, 1996).

İkincisi, kırılma ve gözenek çöküşü etkileri azaltılmalıdır. Bu da yine yüksek miktarda alkol ve çözücü kullanımından kaynaklanan bir problemdir ve giderilmesi için çözücü:başlatıcı miktarı ile kurutma işleminin çok iyi kontrol edilmesi gerekir. Ayrıca gliserin ve poli(vinil alkol) ve poli(gliseroksisiloksan) gibi katkı maddeleri de bu amaç için kullanılmalıdır.

Son olarak, sol jellerin gözenek ve mekanik kararlılıkları geliştirilmelidir. Bu zellikler, hızlı-yanıt sensörleri, hastalık teşhisleri ve yüksek verimli reaktörlerdeki biyo-katalizörler için çok önemli bir parametredir. Düşük poroziteli sol-jellerdeki, difüzyona karşı dirençler, katalitik etkinliği ve hızlı yanıt profilini olumsuz etkilemektedir. Bu problemten, mezoporoz yapılı sol-jel sentezlenerek kaçınılabilir.

Çizelge 2.2. Biyoimmobilize Sol-Jellerin önemli özellikleri ve Avantajları.

- Sol-jeller geleneksel polimerlerle karşılaştırıldığında, mekanik kararlılıkları daha yüksek ve kimyasal ve biyolojik degradasyona karşı daha dirençli materyallerdir.
- Poroziteleri yüksek materyaller retilabilir ve gözenek yapıları; başlatıcıların, katkı maddelerinin ve polimerizasyon şartlarının uygun olarak seçilmesiyle kontrol edilebilir.
- Sol-jeller içerisinde, biyolojik türler kalıcı olarak tutuklanabilir ve yüksek aktivite gösterebilirler.
- Tutuklanan biyomoleküllerin, termal ve kimyasal denatürasyona ve proteolitik ataklara karşı dirençleri artar. Saklama koşulları ve işlem koşullarına karşı kararlılıkları artar.
- Biyoimmobilize sol-jeller, gaz, sıvı, katı-sıvı ve süperkritik ortamlarda fonksiyonlarını sürdürürler.

2.2. Kütle Spektrometrisi

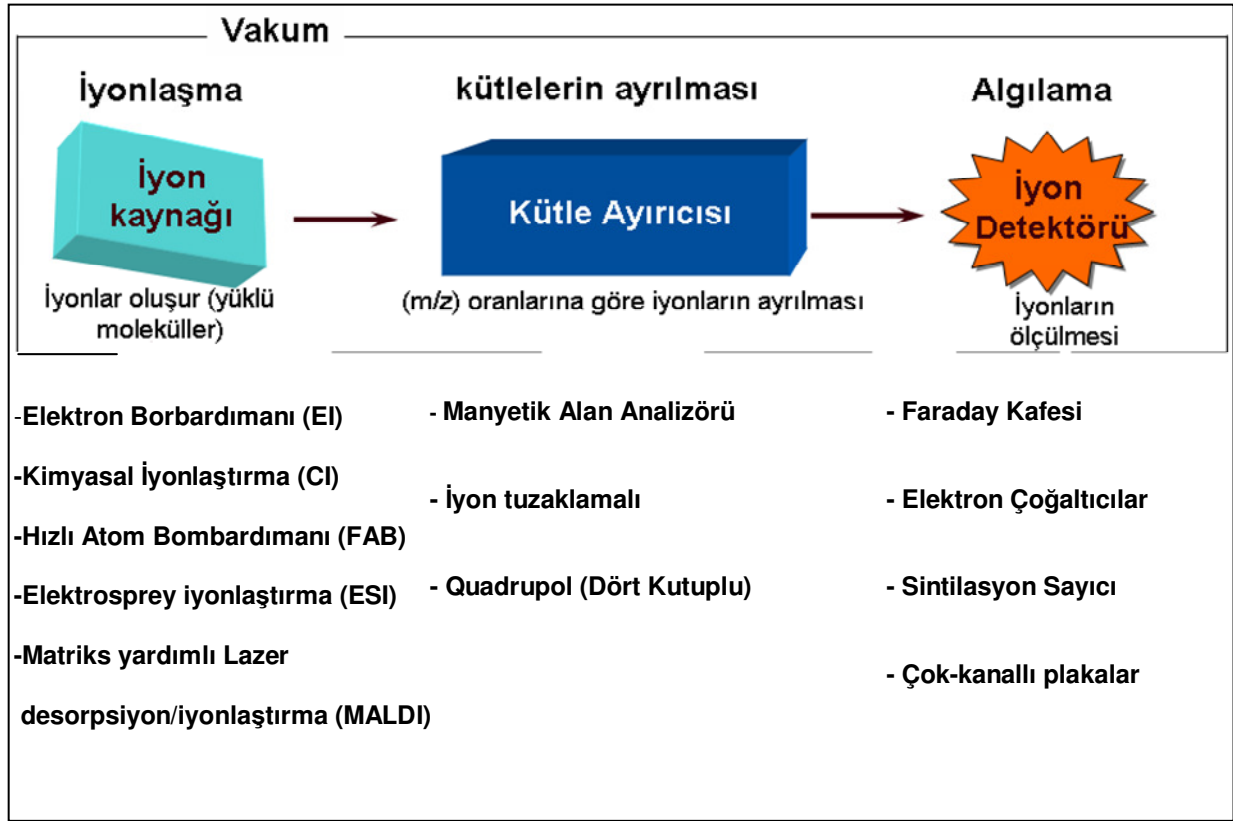
Kütle spektrometrisi, protein ve DNA analizlerinde kullanılan günümüzün en güçlü araçlarından biridir. 500.000 Da gibi büyük biyomoleküllerin kütleleri dahi çok büyük bir doğrulukla belirlenebilir. Ayrıca peptitlerdeki aminoasit dizilimleri veya bir oligosakkaritin şeker dizilimleri gibi dizi analizleri, kısa zamanda, yüksek bir doğrulukla ve biyomoleküllerin yapısından kaynaklanan pek çok sınırlamadan etkilenmeksizin yapılabilmektedir. Bazı kütle spektrometreleri, gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi veya kapiler elektroforez gibi ayırma metodlarıyla birleştirilerek çok daha etkin analizlerin yapılması sağlanmıştır (Manz ve ark., 2003).

Bunun yanında büyük molekül ağırlıklı moleküllerin (özellikle biyopolimer ve sentetik polimerler) Kütle Spektrometrik şartlarda uçuculukları hemen hemen yok denecek kadar az ve kararlılıkları çok düşüktür. Bu nedenle molekül ağırlıklarının ve molekül kütlelerinin tayini mümkün olmamaktadır. 1990'lı yılların başına kadar kullanılan ticari Kütle Spektrometreleri ile maksimum ulaşılan molekül kütlesi 4.000 Dalton'dan öteye gidememiştir. Daha büyük molekül ağırlıklı maddelerin Kütle Spektrometreleri ile analizlerinde başarı sağlanamamıştır. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşma (MALDI, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization) kütle spektrometresi ve Elektrosprey İyonlaştırma (ESI, Electrospray Ionization) kütle spektrometresiyle tanışma bu alanda bir devrim yaratmıştır. "Yumuşak iyonlaştırma" teknikleri olarak da bilinen bu tekniklerle, proteinler ve diğer biyomoleküllerin kütlelerinin, bir bütün halinde (intact), yapıyı bozmadan mükemmel bir doğrulukla ölçebilmesi başarılmıştır (Salih, 2005).

2.2.1. Kütle spektrometrisinin genel prensipleri

Genel olarak bir kütle spektrometresi, gaz fazındaki iyonların moleküler kütlelerini belirler. Basitçe bir kütle spektrometresi analizinde; ilk olarak, örnek molekülleri iyon kaynağında iyonlaştırılır, gaz fazındaki bu iyonlar daha sonra bir kütle analizöründe kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılır, dedektöre ulaşan iyonların kütle/yük oranları belirlenir ve dedektörden alınan sinyaller bilgisayara aktararak spektrum kaydedilir (Şekil 2.12). Kütle spektrometresinin en önemli parametrelerinden biri de, analizin iyonlar ve hava molekülleri arasındaki

muhtemel çarpışmaları engellemek amacıyla, yüksek vakum altında (en az 1×10^{-5} Pa) gerçekleştirilmesi zorunluluğudur.



Şekil 2.12. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri

2.2.1.1. İyonlaştırma

Örnek molekülleri değişik birçok teknikle iyonlaştırılabilir. Elektron borbardımanı iyonlaşma (EI) tekniğinde elektronlar örnek molekülden koparılır, kimyasal iyonlaştırmada (CI) ise örnek molekülleri reaktif bir gaz ile çarpıştırılır. Örnek, hızlı atom bombardımanı (FAB) iyonlaşma tekniğinde, argon atomlarıyla bombardımana maruz kalır veya elektrosprey iyonlaşmada, örnek çözeltisi elektriksel bir alan içerisine püskürtülür. Bunlara ek olarak, Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/ionlaşmalı (MALDI) tekniğinde örnek, matriks molekülleriyle birlikte kristallendirilir ve sonra lazer ışınlarıyla iyonlaştırılır.

Tüm bu tekniklerle, gaz fazında pozitif ve/veya negatif yüklü iyonlar oluşturulur. Sert iyonlaşma tekniği olarak da adlandırılan EI ve FAB gibi teknikler, molekülün daha küçük parçalara parçalanmasına neden olurlar. Bu parçalanmalar her

molekül için kendine özgü olup, moleküle ait bir parmak izi olarak tanımlanır. Bu tür sert iyonlaşma tekniklerinde, yapıda meydana gelen parçalanmalar büyük molekül ağırlıklı moleküllerin analizini imkansız hale getirir. FAB iyonlaşma tekniğiyle ancak 4.000 Da'dan daha küçük moleküllerin analizi gerçekleştirilebilir. Yumuşak iyonlaşma tekniklerinde ise (MALDI ve ESI), molekülde herhangi bir parçalanma meydana gelmeden, M^+ ve $[M+H]^+$ moleküler iyon pikleri oluşur. Bu şekilde örneğin MALDI tekniğiyle 1.000.000 Da kadar molekül kütleleri tayin edilebilir (Manz ve ark., 2003).

2.2.1.2. Kütle analizörü

Kütle analizörü, iyonlaşmış türlerin kütle/yük (m/z) oranlarına göre birbirinden ayrıldığı kısımdır. Manyetik alan veya elektriksel alan, iyon tuzaklamalı, yüksek frekanslı bir quadrupol manyetik alan veya uçuş zamanlı kütle analizörleri bu amaç için kullanılır. Kütle analizörleri içerisinde en sık kullanılanlardan biri uçuş zamanlı (TOF) kütle analizörüdür ve en çok MALDI tekniğinde kullanıldığı görülmektedir. TOF kütle analizöründe izlenecek bir iyonun kütlesi için teorik olarak bir limit yoktur. Burada temel prensip, farklı kütlelerdeki iyonların vakum atmosferinde uçuş hızlarının farklılığıdır. Uçuş zamanlı kütle analizöründe (TOF) iyonları hareketlendirmek için elektriksel bir alan uygulanır ve dedektöre çarpma süreleri belirlenir. Eğer iyonların yükleri aynı ise kinetik enerji belirleyici olur yani iyonların hızları yalnızca kütlelerine bağlı olacaktır. Büyük molekül ağırlığına sahip olan iyonların hızları, küçük iyonlara göre daha düşüktür. Bu şekilde farklı zamanlarda dedektöre çarparak kütleleri belirlenir (Wollnik, 1993).

2.2.1.3. Dedektörler

Kütle spektrometresinin son basamağı, oluşturulan ve birbirlerinden ayrılan iyonların, belirlenmesi ve verilerin kaydedilmesi işlemidir. Bu amaçla kütle spektrometresinde, Faraday kafesi, elektron çoğaltıcısı, sintilasyon sayıcısı ve fotoğraf plakası gibi dedektörler kullanılır. Kütle spektrometresinde iyonları algılamak için kullanılan dedektörlerin en basiti *Faraday kafesidir*. Bu dedektörde bir iletken kafes, spektrometrenin öteki kısımlarına göre negatif bir potansiyelde tutulur ve böylece bu kaba doğru çekilen pozitif yüklü iyonlar elektrik akımı oluştururlar. Kütle spektrometresinde kullanılan bir başka dedektör türü *elektron*

çoğaltıcısı adını alır. Bu düzenekte dedektöre çarpan pozitif yüklü iyonlar yüzeyden birkaç elektron fırlatır, fırlatılan elektronlar başka bir yüzeye doğru yönlendirilir ve bu işlem birkaç yüzeyde tekrarlanır. Bu elektrotlar anotta tutularak elektrik akımına dönüştürülür. *Sintilasyon sayıcısı* adını alan bir başka dedektörde ise iyonlar luminesans özelliğine sahip bir ekrana çarpar ve foton yayılmasına neden olurlar. Yayılan bu fotonlar bir fotoçoğaltıcı yardımı ile kaydedilir. Çok sık kullanılan bir diğer dedektör türü de, *fotoğraf plakasıdır*. Bu dedektör iyonları teker teker değil, tümünü birden algılar. Plakaya çarpan iyonlar kararmaya neden olur ve bu kararma miktarı ölçülür. Özellikle MALDI-MS tekniğinde sıklıkla kullanılan dedektörler ise, çok kanallı plaka dedektörleridir.

Bazı dedektörler tek yüklü iyonlara daha duyarlıdır, bazı dedektörler nitel analizlerde de kullanılabilir. Bu doğrultuda yapılacak analizin amaçlarına göre uygun dedektör seçimi yapılır (Pasch ve Schrepp, 2003).

Farklı iyonlaşma yöntemlerinin farklı kütle ayırıcıları ve dedektörlerle oluşturabilecekleri değişik kombinasyonlarla kimya, biyoloji ve bilimin diğer sıcak alanlarında birçok maddenin yapısal tayinini ve karakterizasyonunu mümkün kılan birçok farklı kütle spektrometresi oluşturulabilmektedir. Çeşitli maddeler ve amaçlar için ortaya çıkan bu farklı sistemler kütle spektrometrisini disiplinler-arası araştırma alanlarının hemen hemen her aşamasında ihtiyaç duyulan çok amaçlı ve güçlü bir teknik haline getirmiştir.

Klasik yöntemlerin 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 yapılı bileşiğin yapısal analizi için kullanılan bu teknik, uzunca bir zaman karmaşık organik moleküller için kullanılabilir olmamıştır. Zira uygulamada ilgili bileşiğin buharlaştırılması ve iyonlaştırılıp vakum ortamında hızlandırılması 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 iyonlaşma süreçleri de muhtelif zorluklar taşımaktadır. Sonuçta her hangi bir teorik engel olmamasına karşın pratikte uygulama, uzunca bir süre mümkün olamamıştır. Bu kısıtlamayı değiştiren şey ise proteinleri tahrip etmeden buharlaştırıp, iyonlaştırmayı başaran, biri Nobel ödüllü iki tekniğin geliştirilmiş olmasıdır. Bu aşamada buharlaşmış ve iyonlaşmış protein ve/veya peptit molekülleri spektrometrik analize hazır duruma getirilmiş olur. MALDI ve ESI tekniklerinin geliştirilmesi, biyoanalitik kimyada ve özellikle protein veya DNA moleküllerinin analizlerinde tam manasıyla bir dönüm noktası olmuştur (Cotter, 1997).

2.2.2. Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaşmalı - uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF/MS)

Koichi Tanaka proteinlerin “lazer desorpsiyonlu yumuşak iyonlaşması” (SLD) çalışmalarını 1987’de yayınlamıştır. Ancak, bu SLD çalışmalarının, daha etkili ve daha yaygın bir kullanıma sahip olan yeni versiyonunu, 1990 ların başında iki Alman bilim adamı Prof. F. Hillenkamp ve Prof. M. Karas, yepyeni bir Kütle Spektrometrik teknik olarak tasarladılar. Yaptıkları bu çalışma ile American Chemical Society’nin 1995 yılındaki ödülüne layık görüldüler. Kullandıkları yeni Kütle Spektrometrik sistemin iyonlaştırma kaynağının dışındaki analizör ve dedektör sistemleri daha önceki Kütle Spektrometrelerinde var olan kısımlardan hemen hemen farklılık göstermemekle birlikte, yeni bir iyonlaştırma kaynağı tasarlamışlardır. Bu iyonlaştırma kaynağına, Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization) adını verdiler. Daha sonra 2002 yılında Tanaka, bu çok önemli buluşuyla Nobel ödülüne layık görüldü (Manz ve ark., 2003).

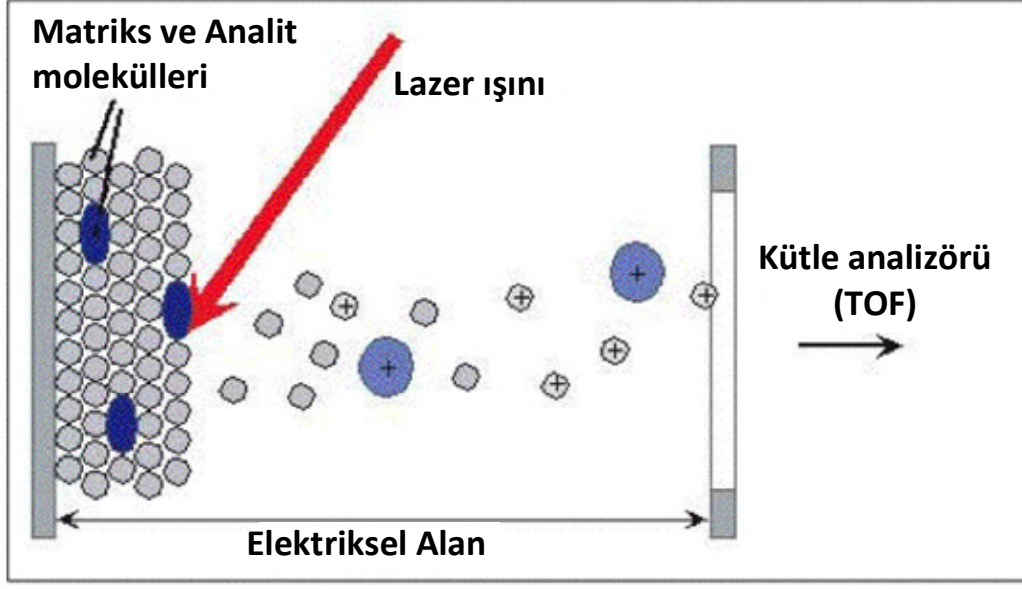
MALDI-TOF-MS tekniğinde, 1.000.000 Da’ya kadar molekül ağırlığına sahip moleküllerin analizi uygun ortam, matriks ve dedektörler kullanılarak, çok büyük bir yüzde doğrulukla gerçekleştirilebilmektedir. MALDI-MS sisteminde büyük molekül ağırlıklı maddelerin analizlerinin yapılması yanı sıra sistemin hassiyeti oldukça yüksek olup akto mol (1×10^{-15} mol) düzeyinde çalışmalar rahatlıkla yapılabilmektedir. Kesin olarak molekül ağırlığı tespit edildiğinden dolayı tür analizleri kolayca gerçekleştirilebilmektedir. MALDI-MS sisteminin en önemli avantajlarından biri de molekül ve zayıf kompleks yapıların yumuşak (soft)

iyonlaştırılmasının yapılabilmesi nedeni ile kararsız bileşik ve komplekslerin yapıları bozulmadan, dahası da biyopolimerlerin kapalı (folded) yapıları bile bozunmadan gaz fazına geçirilip iyonlaştırıldıktan sonra tayin edilebilmesidir (Salih, 2005).

2.2.2.1. İyonlaştırma prensipleri

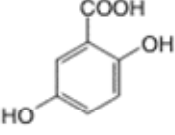
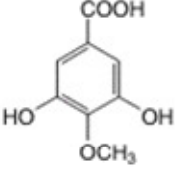
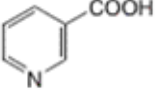
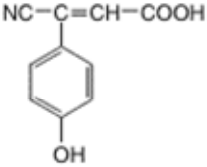
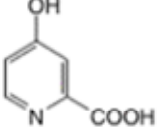
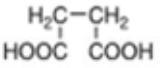
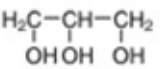
MALDI-MS sisteminde iyonlaştırma prensibi, vakum atmosferindeki katı örnek moleküllerinin yumuşak desorpsiyonu ve iyonlaşması temeline dayanır. İlk önce örnek, matriks molekülleriyle beraber metal bir örnek tutucu üzerinde birlikte kristallendirilir. MALDI yönteminde, sinapinik asit gibi UV bölge ışını absorplayabilen, küçük organik asitler matriks olarak kullanılır (Çizelge 2.3.). Numunenin MALDI kütle spektrometresine girişini sağlayan örnek tutucu ile uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) girişi arasına elektriksel bir alan uygulanır (Şekil 2.13). Daha sonra örnek-matriks karışımı, kesikli bir lazer ışınına maruz bırakılır. Bu aşamada, lazer kaynağından yayılan ışının dalga boyunda kolayca absorpsiyon yapabilen uygun bir matriksin seçilmesi çok önemlidir, aynı zamanda örnek molekülleri bu dalga boyunda ışını absorplamamalıdır. Lazer kaynağından yayılan fotonlarla, örnek-matriks kristalleri bombardıman edildiğinde, matriks molekülleri hemen uyarılır ve enerjisini komşu moleküllere aktarmadan önce örnek molekülleriyle beraber gaz fazına geçer ve bazı analit ve matriks molekülleri bu işlem esnasında iyonlaşır. Gaz fazındaki iyonlar, elektriksel bir alan uygulanarak, uçuş zamanlı kütle analizörüne (TOF) doğru hızlandırılırlar. Matriks molekülleri, analit moleküllerinden proton alarak ya da vererek, iyonlaşma enerjisini transfer ederler. Genelde elde edilen analit iyonları $[M-H]^+$ veya $[M+H]^+$ molekül iyonları olduğu gibi, tampon çözeltilerinden gelen alkali metal iyonlarının katılmasıyla $[M+Na]^+$ iyonları da olabilir. Ayrıca çok yüklü moleküler iyonlar da oluşabilir. Matriks derişiminin yüksek olmasının bir sonucu olarak (analite göre ortalama 100-1000 kat aralığında), analit iyonlarının birbirleriyle etkileşmeleri engellenir. MALDI yumuşak bir iyonlaşma tekniğidir ve bu sayede proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler ve lipitler gibi büyük biyomoleküller yapıları bozulmadan (intact) analiz edilebilir. Matriks olmazsa bu analitler yüksek enerjide yalnızca desorbe olurlar ve bu da analit moleküllerinin parçalanmasıyla sonuçlanır. Azot lazerleri 337 nm dalga boyunda ışın yaparlar ve UV-bölgede absorpsiyon yapan

matriksler için en yaygın kullanılan lazer kaynağıdır. Buna alternatif olarak, Nd-YAG lazerleri 266 nm ya da 355 nm dalgaboylarında kullanılabilir. IR-lazerleri, UV-lazerlerine göre daha yumuşaktır ancak IR bölgede absorpsiyon yapabilecek matriks sayısı sınırlıdır. En sık kullanılan IR Lazerleri, Er-YAG lazerleri ve CO₂ lazerleridir.



Şekil 2.13. Matriks yardımcı lazer desorpsiyonunun prensibi.

Çizelge 2.3. Biyokimyasal analizlerde MALDI matriksi olarak kullanılan bazı matriks molekülleri.

Bileşik	Dalgaboyu	Kullanımı
2,5-Dihidroksi benzoik asit (DHBA) 	337 nm 355 nm	peptitler, proteinler, oligosakkaritler
Sinapnik asit (SA) 	337 nm 355 nm	proteinler, peptitler, glikoproteinler
Nikotinik asit 	266 nm	peptitler, proteinler, oligonükleotitler
α -Siyano-4-hidroksi-sinamik asit (α -CHCA) 	337 nm 355 nm	peptitler, proteinler, oligosakkaritler
4-Hidroksi-pikolinik asit 	337 nm 355 nm	oligonükleotitler
Süksinik asit 	2.94 μ m 10.6 μ m	peptitler, proteinler,
Gliserin 	2.79 μ m 2.95 μ m 10.6 μ m	peptitler, proteinler,

Çizelge 2.4. MALDI-MS de kullanılan Lazer kaynakları.

<u>Lazer Kaynağı</u>	<u>Çalışma Dalgaboyu (nm)</u>
Azot Lazeri	337
Eximer Lazeri	266
IR Lazer (CO ₂)	1060

2.2.2.2. Uçuş zamanlı analizörde kütle analizi

MALDI'de en sık kullanılan kütle analizörü, büyük moleköl ağırlıklı türler için bile, yüksek ayırıcılık ve doğrulukla kütlelerin belirlenmesini sağlayan uçuş zamanlı kütle analizörüdür (TOF). Lazer ışını tarafından desorbe edilen iyonlar, elektriksel alan içerisinde belli bir kinetik enerjiyle hızlandırılırlar (Şekil 2.14). Daha sonra bu iyonlar, elektriksel alan uygulanmayan bir tüp içerisine girerler ve burada kütle/yük oranlarına göre farklı hızlarda hareket ederler. Tüpün sonunda, iyonlar dedektöre çarparlar ve uçuş zamanları yüksek bir doğrulukla elektronik olarak ölçülür. Hareket eden iyonların kinetik enerjileri teorik olarak şu eşitlikle tanımlanır :

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot V \quad (2.5)$$

burada " m " iyonun kütlesi, " v " iyonun hızlandırma bölgesinden sonraki hızı, "z" iyonun yükü, "e" temel yük ve "V" uygulanan elektriksel alanın gerilimidir. Serbest yol içerisinde sürüklenen küçük iyonlar, büyük iyonlara göre daha fazla hız kazanırlar ve dedektöre daha önce ulaşırlar. Burada hız " v " , elektriksel alan uygulanmayan sürüklenme tüpünün (serbest yol) uzunluğunun "L" , uçuş zamanına "t" bölünmesi olarak da tanımlanabilir ;

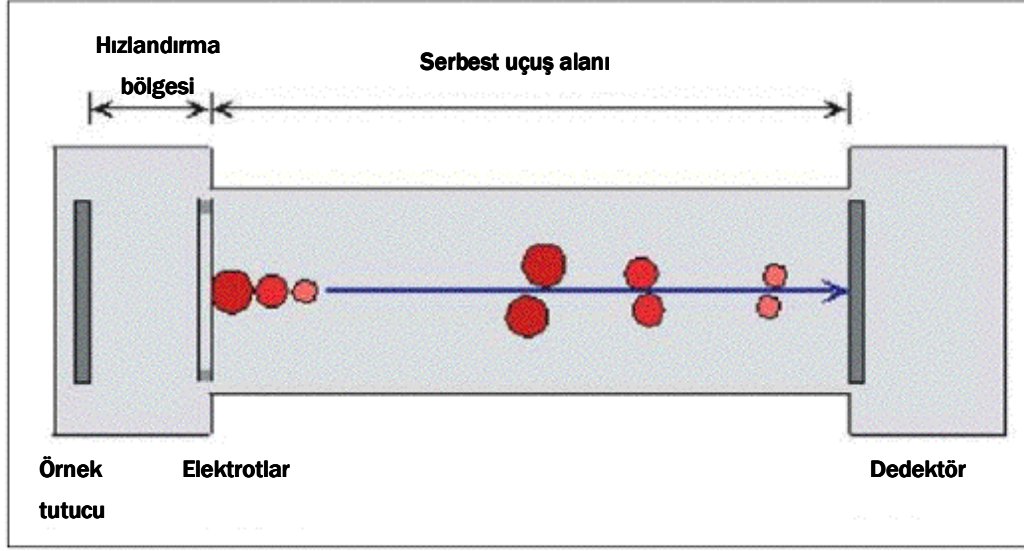
$$v = \frac{L}{t} \quad (2.6)$$

Eşitlik 2.2.'deki hız ifadesi, eşitlik 2.1'de yerine yazılırsa ;

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot V}{L^2} \cdot t^2 \quad (2.7)$$

Burada m / z oranı, uçuş süresinin karesi ile doğru orantılıdır. Bu yüzden bir iyonun kütlesi, analizörün kütlesi ve yükü bilinen örneklerle bir kez kalibre edilmesiyle, uçuş zamanı ölçülerek belirlenebilir. Bu şekilde süre ölçümü ile, büyük

iyonlar dahi yüksek bir doğrulukla saptanabilir bu da biyomoleküllerin moleküler ağırlıklarının tayini için uçuş zamanlı kütle analizörünü (TOF) en ideal yöntem yapar. Tipik olarak uçuş tüpleri yaklaşık iki metre uzunluğundadır. Diğer analizörlerle kıyaslandığında, bu yöntemin duyarlılığı çok iyidir, çünkü uçuş zamanlı analizör içerisinde ön ayırmadan geçen bütün iyonlar dedektöre ulaşır (Manz ve ark., 2003).



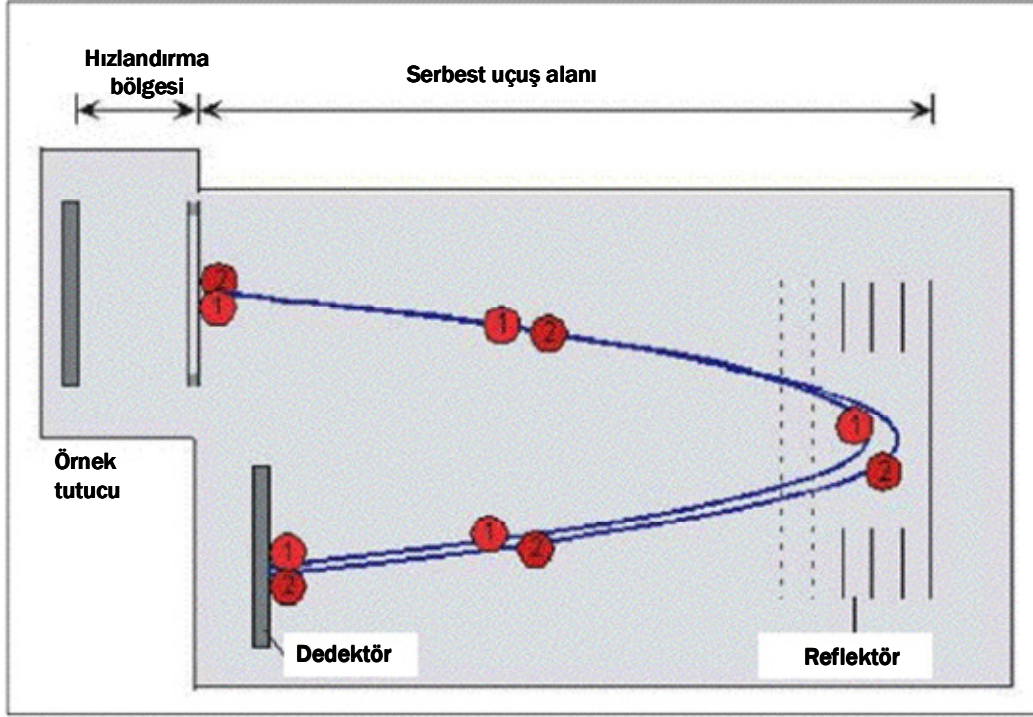
Şekil 2.14. Lineer uçuş zamanlı kütle analizörünün prensibi: iyonlar, kütle/yük oranlarına göre farklı hızlarda hareket ederler.

Lineer uçuş zamanlı kütle analizöründe ayırıcılık düşüktür (<300). İyonların ilk kinetik enerjileri, uzaysal ve zamana bağlı dağılımları, iyonların tamamının aynı zamanda ve aynı bölgede desorpsiyon yapmamalarında rol oynar. Bu nedenden dolayı aynı kütleyle sahip iyonlar için farklı hızlar belirlenebilir ve bu da piklerin genişlemesine, ayırıcılığın zayıflamasına neden olur. Yansıtıcı (Reflektron) modda TOF analizörü (Şekil 2.15) kullanılarak ayırıcılığın bozulmasına neden olan bu etkiler önemli ölçüde giderilebilir (Cotter, 1997; Nielen, 1999).

Reflektron modunda, TOF analizöründe uçuş tüpünün sonuna iyonların yönünü değiştirecek bir kuvvet uygulayan, karşı bir elektriksel alan uygulanır. Eşit kütleli fakat daha yüksek kinetik enerjili (hızı yüksek) iyonlar, karşı elektriksel alan içinde daha derinlere girerler ve yönlerini değiştirmek için daha uzun süre gerekir fakat

uçuş alanında hızları daha düşük olan iyonlara yetişirler. Bu odaklanma noktası için dedektörün yeri doğru ayarlandığında, çok keskin sinyaller elde edilir.

Lineer mod TOF ile yüksek molekül ağırlıklarına (100-900 kDa) çıkılabilir ancak kütle arttıkça ayırıcılık azalır. Reflektron mod TOF ise düşük molekül ağırlıklarıyla (10-90 kDa) sınırlıdır fakat ayırıcılık (10000 civarında) çok iyidir (Manz ve ark., 2003).



Şekil 2.15. Yansıtıcı (Reflektron) modda TOF analizörünün prensibi.

2.2.2.3. İyonların belirlenmesi

MALDI kütle spektrometresinde dedektör olarak genelde çok kanallı plaklar (MCP) kullanılır. Bu plaklar, fiber optik özellikli, kurşun içeren cam materyallerden yapılmış silindirik birçok kanal içerir. Kanalların çapı 4 μm ile 25 μm arasında değişir ve merkezden-merkeze olan uzaklıkları 6 μm ile 32 μm arasında olabilir (Hoffmann ve ark., 1996).

Bu plakalara çarpan iyonların enerjileri, dedektör yüzeyinde elektriksel enerjiye dönüştürülür. Oluşturulan elektron sinyali yükseltilir ve toplanır. Cihazın dizaynına

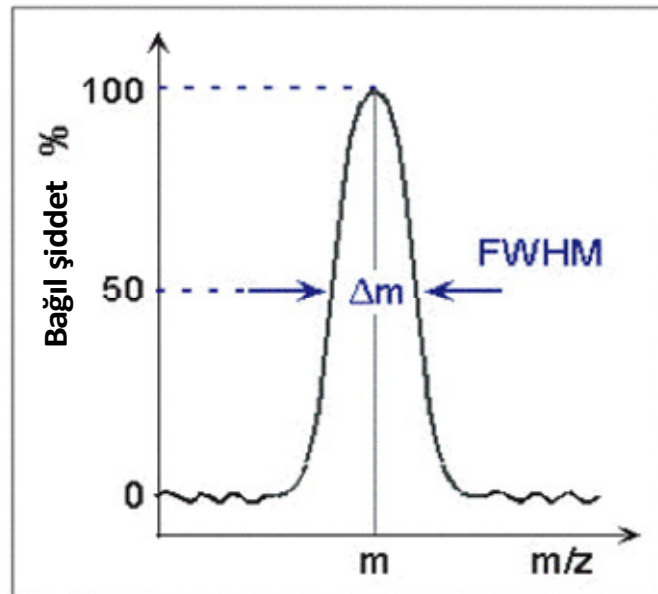
bağlı olarak bu dedektörler tek başına da kullanılabileceği gibi, duyarlılığı artırmak için iki veya üç tanesinin kombinasyonu şeklinde de kullanılabilir.

2.2.2.4 Ayırıcılık

Bir kütle analizörünün kalitesi için çok önemli bir parametre de, küçük kütle farklarına sahip iyonların birbirinden ayrılabilmesini sağlama yeteneğidir. Bu faktör ayırıcılık olarak tanımlanır. Birbirine yakın değerlerde, m_1 ve m_2 kütleli iki iyon için ayırıcılık, R_s , aşağıdaki eşitlikle ifade edilir ;

$$R_s = \frac{m_1}{\Delta m} = \frac{m_1}{m_2 - m_1} \quad (2.8)$$

Genel olarak ayırıcılık yüksekse, ayırmanın iyi olduğu tanımlanır. Ancak Eşitlik 2.4, yükseklikleri yani şiddetleri birbirine eşit veya çok yakın olan iki pik için geçerlidir. Bu koşulun sağlanamadığı durumlarda ayırıcılık tek bir pik kullanılarak da bulunabilir. Uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) için, m değeri yarı yükseklikteki pik genişliği ifadesiyle (FWHM) tanımlanır. (Şekil 2.16) Ayırıcılık, herhangi bir pikin maksimum yüksekliğinin yarısındaki toplam genişliğinden ve o pikin tam ortasına gelen kütle değerinden hesaplanabilir (Hoffmann ve Stroobant, 2002).



Şekil 2.16. Yarı yükseklikteki pik genişliği (FWHM) ifadesiyle ayırıcılık tanımı.

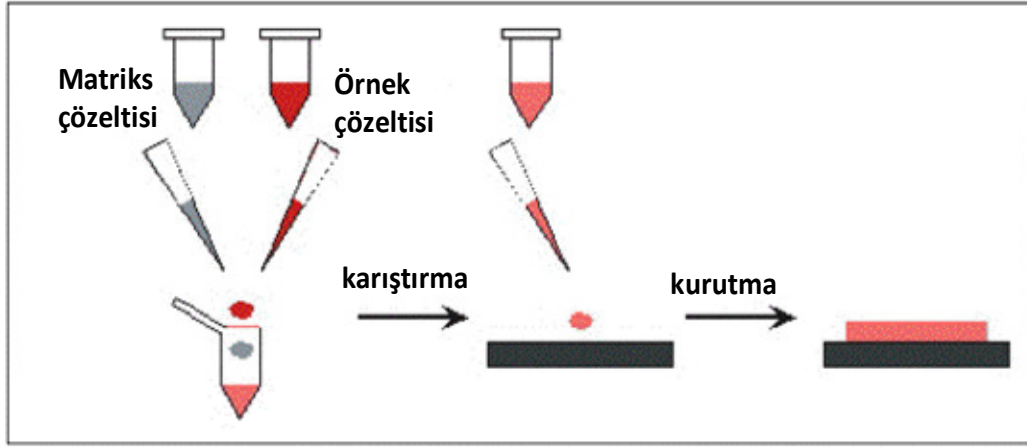
2.2.2.5 Örnek hazırlanması

Belirli bir örnek hazırlama tekniği kullanmadan önce, örnek ve matriks için en uygun çözücünün seçilmesi işlemi çok önemlidir. Sonuç karışımın yalnızca bir çözücüyle elde edilmesi, kristallendirme esnasında meydana gelebilecek ayrılma riskini azaltmak açısından idealdir. MALDI uygulamalarında, örnek molekülleri, miktar olarak çok fazlası uygun bir matriks ile kristallendirilir. MALDI-MS tekniğinde kullanılan matriks çözeltilisinin derişimi analiz türünün derişimine göre 1.000-10.000 kat daha fazladır. Bunun nedeni analiz molekülleri fazla matriks molekülleri yüzünden analiz örneği içerisinde birbirlerinden tamamen ayrılmıştır. Böylece analiz moleküllerinin birbirlerinden etkilenmeden (yani dimer veya trimer oluşturmada) gaz fazına geçebilmeleri mümkün olmaktadır. Burada matriksin fonksiyonu lazer ışınının enerjisini absorplamak ve toplamaktır. Bu sayede analit moleküllerinin yüksek enerji altında yıkımı ve parçalanması engellenmiş olur. İyi bir matriks molekölü lazer ışınının dalgaboyunda güçlü absorpsiyon yapabilmelidir. Ayrıca matriks moleküllerinin diğer özellikleri ise; pozitif iyon çalışmalarında analiz molekülüne bir proton aktararak protonlanmış analiz molekül iyonunu oluşturmada, negatif iyon çalışmalarında analiz molekülünden bir proton alarak deprotone negatif molekül iyonu oluşumunu sağlamaktadır. Bunun dışında matriks, kimyasal olarak inert, vakum atmosferinde kararlı olmalıdır.

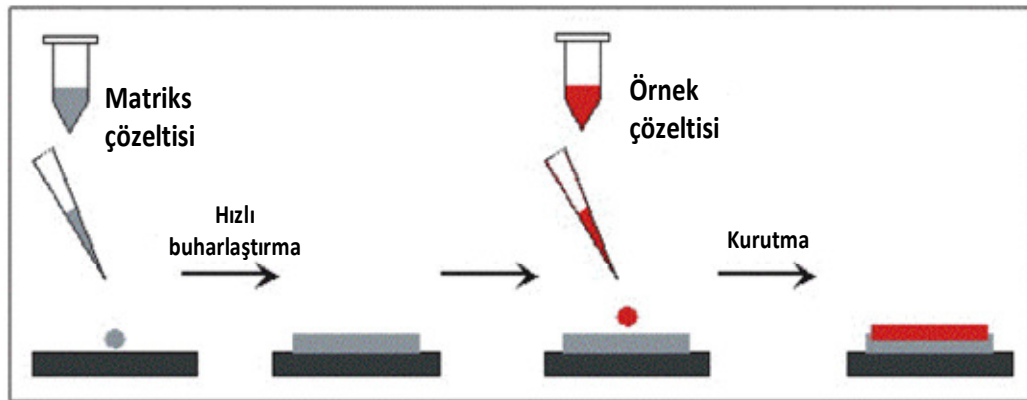
Ancak bu moleküllerin performansları, analit molekülüne ve hazırlama koşullarına bağılı olarak farklılık gösterir. MALDI-MS analizlerinde, en önemli ve zor kısım örnek hazırlama bölümüdür. Çalışılacak analit için, uygun matriksin seçimi, örnek : matriks oranının belirlenmesi, en uygun örnek hazırlama yönteminin uygulanması MALDI-MS tekniğinin etkinliğini önemli ölçüde belirler. Örnek hazırlama yöntemi genel olarak, örnek ve matriks çözeltilerinin hazırlanıp, belirli oranda birbirlerine karıştırılması, daha sonra bu karışımın 'MALDI örnek tutucusu' adı verilen metal bir plak üzerine uygulanmasını ve bu örnek tutucu üzerinde kristallenmesini ve ardından cihaza verilmesi basamaklarını içerir. İyi spektrumlar elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken bir başka nokta da, tampon içerisindeki tuz derişiminin minimuma indirilmesidir (Manz ve ark., 2003; Salih, 2005).

Örnek hazırlama yöntemleri arasında en eski ve en sık kullanılan yöntem "kurutulmuş damlacık (dried droplet)" adı verilen tekniktir (Şekil 2.17) (Karas ve

Hillenkamp, 1988). Bu yöntemde öncelikle doygun bir matriks çözeltisi hazırlanır. Bu matriks çözeltisi, matriksin çözünürlüğüne bağlı olmak üzere, su , su-asetonitril veya su-alkol içerisinde yaklaşık olarak 5-10 g/L derişiminde hazırlanır. İkinci bir ependorf içerisinde, örnek, uygun ve matriks çözeltisi ile karışabilir bir çözücü içerisinde yaklaşık 100 mg/L derişiminde hazırlanır. Daha sonra bu matriks ve örnek çözeltileri uygun oranlarda karıştırılır ve bu karışımın 1 µL'si MALDI örnek tutucusu üzerine uygulanarak oda sıcaklığında kristallenmeleri sağlanır.



Şekil 2.17. Kurutulmuş damlacık metodunun prensibi.



Şekil 2.18. Hızlı buharlaştırma metodunun prensibi.

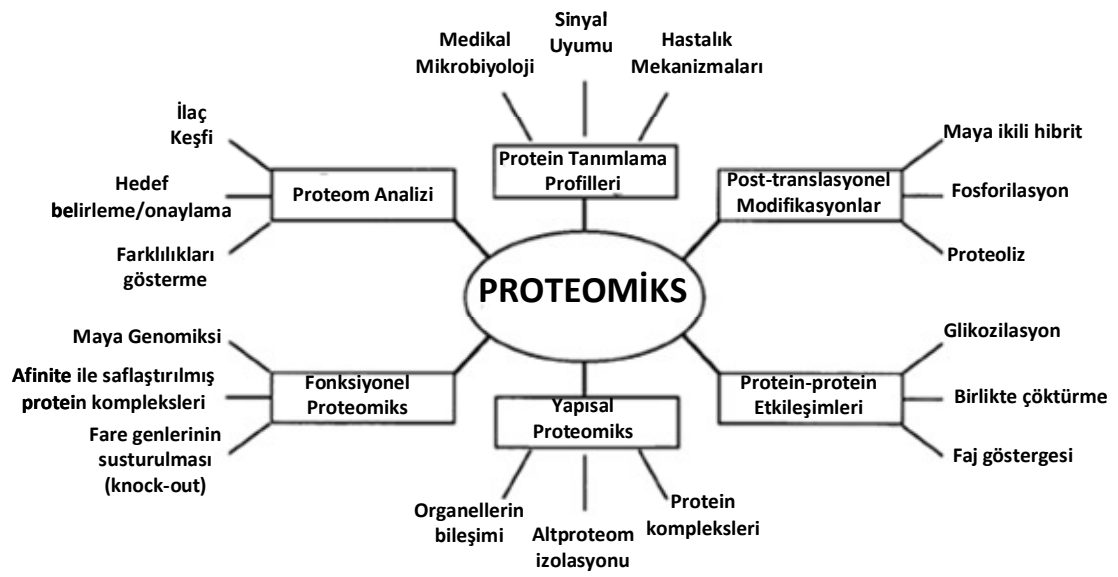
MALDI-MS çalışlarında ikinci bir örnek hazırlama yöntemi de “hızlı buharlaştırma veya hızlı kristallendirme” (Weinberger ve ark., 1993; Nicola ve ark., 1995) adı verilen yöntemdir (Şekil 2.18). Örnek tutucusu üzerine uygulanan matriks-örnek karışımı vakum ortamında bekletilir ve kristallenmenin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesi sağlanır. Çözücü birkaç saniye içinde uçurularak, daha küçük kristaller elde edilmiş olur. Bu teknikle ayrılma problemi de büyük oranda giderilir, bu sayede piklerin şiddeti ve ayırıcılık geliştirilir. Homojenliğin iyi bir şekilde sağlanabildiği ve duyarlılığın daha iyi hale getirildiği bir başka teknik de döndürerek homojen kaplama (spin-coating) tekniğidir (Perera ve ark., 1995). Bir başka önemli bir örnek hazırlama yöntemi ise “ince tabaka” (thin-layer) metodudur. Burada önce matriks çözeltisi örnek tutucusu üzerine uygulanır ve çözücü hızlı bir şekilde buharlaştırılır, matriks molekülleri kristallendirilir. Örnek tutucusu üzerinde ince bir tabaka elde edilir. Daha sonra örnek çözeltisi bu ince matriks tabakasının üzerine uygulanır ve hızlı bir şekilde kristallendirilir. İster “kurutulmuş damlacık” ister “ince tabaka” metodu olsun her iki yöntemde de bir temizleme yöntemi, MALDI örnek tutucusu üzerine direk olarak uygulanabilir. Bir su damlası MALDI plağının üzerindeki her bir noktaya (spota) eklenir. Birkaç saniye bekletildikten sonra su damlası yeniden mikropipet yardımıyla geri çekilir ve noktalar MALDI-TOF kütle spektrometresine yerleştirilmeden önce kurumaya bırakılır. Bu basamak, tuzlar ve kurutulmuş kristaldeki hidrofilik moleküllerin giderilmesini sağlar (Çal, 2008).

2.3. Proteomiks

Proteomiks ilk kez Marc Wilkins ve arkadaşlarınca 1995 yılında, hücre, doku ve organizmadaki tüm protein komplementlerinin karakterizasyonu şeklinde tanımlanmış bir kavramdır (Anderson ve Anderson, 1996; Wilkins ve ark., 1995). Günümüzde ise iki tane proteomiks tanımlaması karşımıza çıkmaktadır. Birincisi, daha klasik bir ifadeyle, gen ürünlerinden yalnızca proteinlerin analiz çalışmaları şeklinde sınırlandırılmış bir tanımdır. Daha kapsamlı olan ikinci tanımlama ise, protein çalışmaları ile m-RNA analizleri, genomiks ve hibrit çalışmaları gibi genetik okuma analizlerini birleştirir (Pandey ve Mann, 2000). Bu şekilde daha kapsamlı bir ifadeyle proteomiks kavramı tanımlandığında, bu başlık altında bir çok yeni

çalışma alanları ortaya çıkmış ve gruplandırılmıştır (Şekil 2.19). Protein-protein etkileşimleri, protein modifikasyonları, protein fonksiyon ve lokalizasyon çalışmaları gibi birçok yeni alt başlık ortaya çıkmıştır.

Proteomiks çalışmalarının amacı yalnızca, bir hücre içerisinde bulunan bütün proteinleri saptamak değil, aynı zamanda proteinlerin bulundukları yerleri ve durumları gösteren üç-boyutlu hücre haritaları ortaya çıkarmaktır. Bu büyük amaçlar doğrultusunda moleküler biyoloji, biyokimya ve biyoinformatik gibi birçok disiplinin ortak çalışmalarına ihtiyaç duyulur (Graves ve Haystead, 2002).



Şekil 2.19. Proteomiks türleri ve biyolojideki kullanım alanları.

2.3.1. Genomiks ve proteomiksin kökeni

Genom, bir organizmanın bütün DNA'sı, bir başka deyişle, genetik yapısı olarak da ifade edilebilir. Değişik organizmaların büyüklükleri önemli farklılıklar gösterirler. Örneğin E.coli bakterisinde genom $4,5 \times 10^6$ baz çiftinden oluşmuşken, insanda $3,2 \times 10^9$ baz çiftine ulaşır. Bitki, hayvan gibi çok hücreli canlılarda hemen her hücre tam genomu içerir (insanda olgun alyuvarlar genom içermezler). İnsan genomu, 50-250 milyon baz çifti içeren 24 kromozom halinde düzenlenmiştir. Bu kromozomlara dağılmış olan genlerin sayısı, yaklaşık 35 bin kadardır. Genler, organizmadaki işlevsel moleküller olan proteinleri kodlarlar. Bütün genomun ancak yaklaşık %2'sini oluşturan genlerin içerdiği dizilim hataları (mutasyonlar),

organizmalarda yapı ya da işlev bozukluklarına, bir başka deyişle hastalıklara neden olabilirler. 1945'te ABD Kongresi, Enerji Bakanlığını yeni enerji kaynakları ve teknolojileri geliştirmekle, bu yeni enerjilerin üretim ve kullanımının sağlık ve çevre açısından sakıncaları olup olmadığının derinlemesine araştırılmasıyla görevlendirdi. 1986'da Enerji Bakanlığı, belirtilen görevinin çerçevesinde insan genomu dizisinin belirlenerek bir referans oluşturması için insan Genomu girişimini başlattı ve Ulusal Sağlık Enstitülerinin de işbirliğiyle 1990'da "İnsan Genom Projesi" başlatıldı. İnsan Genomu Projesinin temel amacı, tüm insan genomunun dizisini ve bütün genlerini belirleyerek bir kaynak oluşturmaktır. Bunun yanı sıra diğer organizmaların da genom dizilerini belirleyerek insanınkiyle karşılaştırmak, bunun gerçekleştirilmesi için yeni teknikler geliştirmek ve elde edilecek bilgileri tarım, sağlık, çevre, enerji gibi alanlarda değerlendirmektir. Haziran 2000'de İnsan Genomunun taslak dizisi açıklandı. Bunun ardından giderek artan bir ivmeyle insan ve başka organizmaların genom dizilerinin belirlenmesi devam etti. İnsan Genomu Konsorsiyumu'nun elde edilen yeni verileri hızla ve karşılıksız olarak bilim dünyasına yayması bu başarıya büyük katkı sağladı. Şubat 2001'de İnsan Genomu Projesi ve Celera şirketi araştırmacıları, insan genomu taslağını ve elde edilen tüm verileri açıkladılar. Tam amaca ulaşmak için aşılacak çok yol olmasına karşın bu gelişme insanlık tarihinin en önemli araştırmalarından biri olarak kabul edildi. En çarpıcı veriler insan gen sayısının, beklenenin 1/3 ü kadar; 35 bin dolaylarında olduğunu gösterdi. Çok kısa bir dönem öncesine kadar *bir gen*, belli bir genetik karakteri kontrol eden ve özellikle bir protein ya da RNA molekülüne karşılık gelen bir DNA parçası şeklinde tanımlanıyordu. Bugün ise, İnsan Genomu Projesi'nin verilerinden yola çıkıldığında gen kolayca tanımlanamıyor. İnsanın tüm karmaşık yapısına karşın, 35.000 genin işlevlerinin "bir gen=bir protein" düşüncesiyle açıklanmasının olanaksız olduğu görüldü.

Genomiks ve açılımı genom projesi görevini gerçekleştirirken bu fikirden doğan proteomiks kavramı hızla gelişmeye başladı (Çırakoğlu, 2002).

2.3.2. Niçin proteomiks çalışılır?

Proteomik en genel anlamda gen ve hücre fonksiyonlarının doğrudan doğruya protein düzeyinde belirlenmesi ile ilgili olan bir bilim dalıdır. Bu amaçla, genetik düzenleme (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.) (Pennisi, 2003).

Bu noktada görüldü ki, canlı organizmalara ait birçok bilgi yalnızca genom çalışmaları yürütülerek elde edilemez. Örneğin canlıların fenotipinden genler değil, proteinler sorumludur. Hastalıklar, yaşlanma ve çevresel etkilerin mekanizmaları gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları, yalnızca genom çalışmalarıyla aydınlatmak imkansızdır. Ancak proteomiks çalışmaları yürütülerek, proteinlerin etkileşim mekanizmaları ve protein modifikasyonları karakterize edilebilir (Graves ve Haystead, 2002).

Aslına bakılırsa insan genom projesi bu şok edici sonuçları vermeden önce düşünülen şey, proje sonunda tüm genlerin ürettiği proteinlerin yalnızca işlevlerinin belirlenmesinin (aminoasit dizileri, nükleotid dizilerinden zaten elde edilebileceğine göre) bütün bilinmeyenleri aydınlayacağı 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 fonksiyonel 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 karmaşık analiz tekniklerine

gereksinim duyulacağı açıktır. İşte “protein kütle spektrometrisi” bu konuda atılmış en ciddi adımlardan biridir.

Bir proteini tanımlamakta kullanılan en temel parametre kütlelerdir. Bir proteinin kütlelerinin bilinme hassasiyeti arttıkça, onun muhtelif etkileşimlerde aldığı rolü bilme imkânı da artar. Kütlelerindeki değişimlere bağlı olarak, bağlı kofaktör veya metal iyonlarının varlığından, kovalent modifikasyonlara kadar pek çok konuda bilgi edinilebilir. İşte bu nedenle protein kütle spektrometrisi, 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.) etkilenmeksizin yapılabilmektedir.

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.

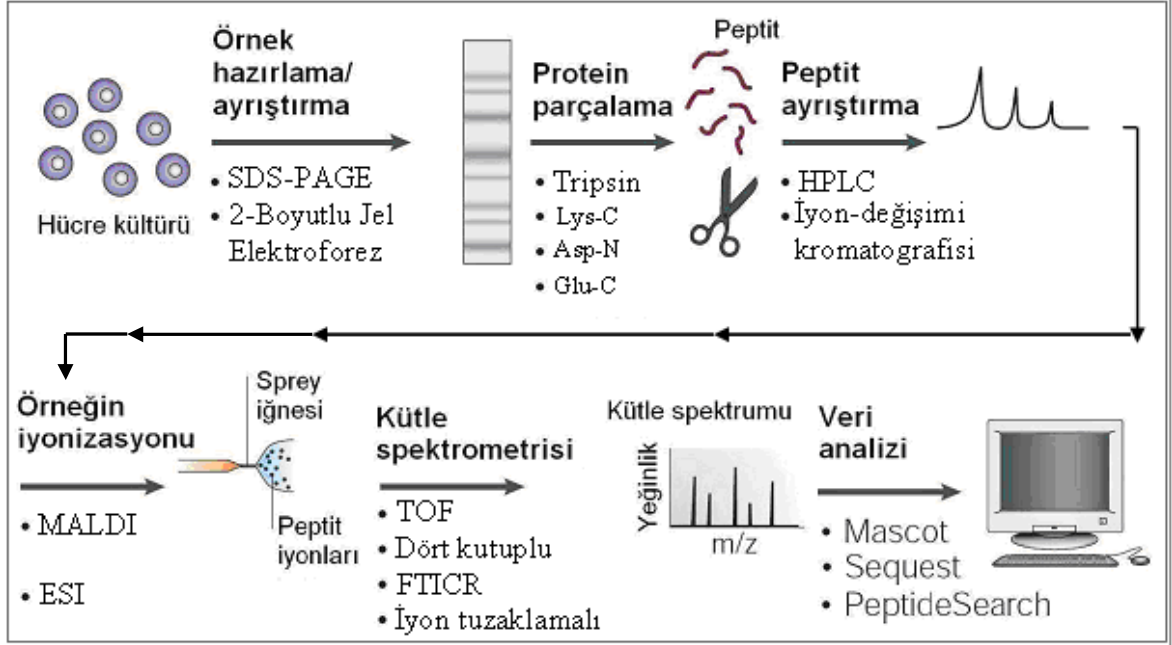
2.3.3. Proteomikte yol haritası

Bugün standart bir proteomiks çalışmasının temel basamakları aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir (Şekil 2.20).

1. Protein örneklerinin ilgili kaynaktan izolasyonu.
2. Protein örneğinin ayrıştırılması (Jel Elektroforez yöntemi).
3. Jelden kazanılan proteinlerin peptitlere parçalanması (Proteolitik enzimler).
4. Peptitlerin saflaştırılması (HPLC veya İyon-Değişimi kromatografisi).
5. Kütle spektrometrisi ile peptitlerin tanımlanması (MALDI veya ESI).
7. Verilerin değerlendirilmesi.

Başlangıçta, protein haritalarının çıkarılmasına yönelik olan proteomiks çalışmaları, 2-boyutlu jel elektroforez tekniğinin kullanıldığı yöntemlere odaklanmıştı. Çalışma alanı protein profillerinin belirlenmesi ile sınırlı kalmayarak, post-translasyonel modifikasyonlar ve protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi gibi çalışmalarla genişledi. Proteinlerin kantitatif ölçümlerinde halen jel elektroforez

temelli proteomiks çalışmaları kullanılmasına rağmen, ileri proteomiks çalışmalarında kütle spektrometrik temeline dayanan yöntemlerle daha duyarlı, özgül ve kesin sonuçlar elde edilmektedir.



Şekil 2.20. Proteomiks çalışmasının temel basamakları.

Kütle spektrometre tekniğine dayanan üç farklı tip proteomiks çalışma yöntemi vardır. Birincisi, karakterizasyona dayalı (karakterizasyonel) proteomiks olarak tanımlanan ve özgül biyolojik koşullar altında proteinlerin birincil yapılarının belirlendiği yöntemdir. İkincisi, türevsel (diferansiyel) proteomiks adını alır. Organizmanın ya da hücrenin belirli bir durumdaki (türevlendirilmesi, gelişme durumu veya hastalık durumu gibi) ya da bir ilaç, kimyasal veya fiziksel uyarıcı ile karşılaşması durumundaki protein yapıları ile sağlıklı durumundaki protein yapılarının karşılaştırmalı olarak belirlendiği yöntemdir. Üçüncü olarak fonksiyonel proteomikte ise, belirli fonksiyonlar gösteren, özgün protein grupları incelenir. Canlı sistemlerde hangi proteinlerin birbirleriyle etkileşimde oldukları belirlenir. Bir çok proteinin fonksiyonu da, diğer proteinler ile etkileşimleriyle ortaya çıkarılır (Marko-Varga, 2004).

2.3.3.1 Proteinlerin izolasyonu ve ayrılması

A) Elektroforetik metodlar

Elektroforez; çözeltideki iyonların elektrik akımının tesiri ile meydana gelen hareketlerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Elektriksel alan içerisindeki göç; elektrik akımının şiddetine, net yüke, molekülün şekline, çözeltinin iyonik gücüne, viskozitesine ve sıcaklığına bağlıdır. Göç hızı, protein molekülü üzerindeki yükün büyüklüğü ile doğru orantılıdır. İyonik bileşiklerin iyonlaşması, elektroforezin temelini oluşturur. Zıt yükteki elektrotlara doğru farklı hızlarda hareket eden değişik yükteki iyonlar elektriksel alanda birbirinden ayrılırlar. Elektroforez, ayrılması istenen iyonları içeren bir çözelti ile kağıt, nişasta agar, selüloz asetat zarı gibi inert bir taşıyıcı materyalin teşkil ettiği bir sistemde de yapılabilir. Protein üzerindeki yüklerin birbirini dengelediği pH'ya o proteinin izoelektrik noktası (pI) adı verilir. Bu pH'da proteinler hem anod, hem katottan aynı kuvvetle çekildikleri için proteinlerin bu pH'daki hareketleri sıfır olur.

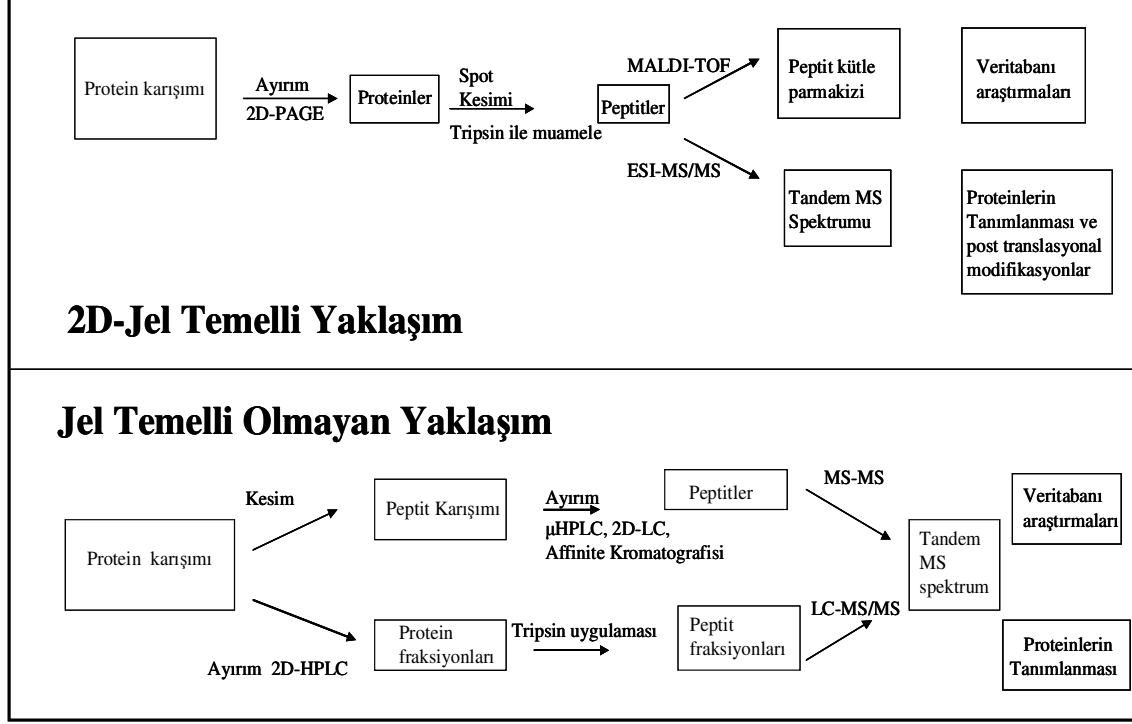
Kullanılan ayırma ortamının cinsine göre çeşitli elektroforez teknikleri kullanılmaktadır. Kağıt elektroforezi, selüloz asetat elektroforezi, agar jel elektroforezi, nişasta jel elektroforezi, poliakrilamid elektroforezi (SDS'siz (Native) ve SDS'li), izoelektrik odaklama (IEF) ve 2DElektroforez bunlar arasında sayılmaktadır.

Poliakrilamid Jel Elektroforez

Akrilamidin bir bağlayıcı (genellikle bis akrilamid) ile polimerizasyonu sonucu oluşturulur. Böylece rastgele büyüyen poliakrilamid ve bis akrilamid derişimleri oluşacak jelin yoğunluğunu, viskozitesini, elastikiyetini ve mekanik dayanıklılığını belirler. Bu derişimlerin arttırılmasıyla oluşan ağın sıklığı da artmakta, buna bağlı olarak gözenek çapı azalmaktadır. Böylece içinden yürüyecek makromoleküllerin hareketi, büyüklüklerine (molekül ağırlıklarına) göre sınırlandırılmış olmaktadır. Akrilamidin, bis akrilamid ile polimerizasyonunu katalizlemek amacıyla amonyum per sulfat (APS) ve tetrametiletildiamin (TEMED) kullanılmaktadır. Poliakrilamid jel elektroforezi:

1)SDS içeren Poliakrilamid Jel Elektroforez , (SDS PAGE , denatüre edici)

2) SDS içermeyen (Native) Poliakrilamid Jel Elektroforez (ND-PAGE, denatürasyona uğramadan yapılan) olarak ikiye ayrılır.



Şekil 2.21. Proteomiks çalışmalarındaki genel iki yaklaşım.

Denatürasyona uğramadan yapılan elektroforez (ND PAGE) : Proteinlerin doğal (intakt) yapılarını bozucu ajanlar kullanmadan yapılan jel elektroforez yöntemidir. Saflık derecesinin tayini için kullanıldığı gibi direk olarak saflaştırma işlemi olarak da kullanılabilir.

Denatürasyona uğratılarak yapılan elektroforez (SDS PAGE) : SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki aminoasitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptitlere de yüksek oranda (-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel derişimi artırılarak protein moleküllerinin moleköl ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır. SDS-PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, moleköl ağırlıklarının saptanması ve derişim çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

İki Yönlü Jel Elektrophorez (2D-PAGE):

İki yönlü jel elektrophorezi, kompleks protein karışımlarının ayrılması ve karakterizasyonunda kullanılan en önemli tekniklerden birisidir. 2D-Elektrophorez binlerce proteinin tek adımda ayrılması açısından önemlidir. Bu yöntem prensipte iki ayırma tekniğinin birleştirilmesi ile gerçekleştirilir.

1. Yönde; İzoelektrik Odaklama (IEF): pH gradientinde yük bağımlı ayırma,
2. Yönde; SDS-PAGE: molekül ağırlığına bağımlı bir ayırma metodudur. Her bir teknik kendi başına 100 bileşiği ayırma kapasitesine sahipken, birleştiklerinde ayırma teorik olarak 10^4 polipeptite çıkar. 2D-Elektrophorez her tip hücre proteinlerinde kullanılabilir (bitki, mikroorganizma, hayvan...). Genel olarak; bir adımda protein izolasyonu, kompleks protein karışımlarının ayrılması, kompleksliğin derecesinin belirlenmesi (heterojenite), polimorfizm tayininde, kalite kontrol ve protein saflığının analizi amacıyla kullanılır (Ekici ve Alişarlı, 2003).

B) Elektrophoreze alternatif yöntemler

Kromatografik teknikler:

Kromatografi: Farklı fazlardaki denge esasına dayanarak, bir hareketli faz ile bir sabit faz yardımıyla karışımın bileşenlerine ayrılması işlemidir. Kromatografi için hareketli faz, sabit faz ve bileşenlerine ayrılacak karışım ile kimyasal tepkimeye girmeyen uygun bir çözelti olabilir; sabit faz olarak da genellikle farklı çaplarda tanecik büyüklükleri olan kristal veya amorf yapıdaki maddeler kullanılır. İşlem sırasında, bileşenlerine ayrılacak derişik haldeki karışım, sabit fazın başlangıç bölgesine konur; sonra sabit fazın başlangıç bölgesinden ileriye doğru hareketli faz ile sürüklenir. Hareketli faz, ilerleyişi sırasında çözdüğü karışımdaki maddeleri de sabit faz üzerinde değışik hızlarda yürütür; bileşenler, sabit fazın farklı bölgelerinde tutulurlar ve böylece birbirlerinden ayrılırlar:

Ayırma mekanizmalarına göre kromatografi türleri şu şekilde verilebilir: İyon değıştirme kromatografisi, Jel filtrasyon kromatografisi, Adsorpsiyon kromatografisi, Dağılma kromatografisi, Affinite kromatografisi.

Ayırıcı materyale göre kromatografi çeşitleri şunlardır:

a) Düzeyssel kromatografi:

- İnce tabaka kromatografisi
- Kağıt kromatografisi

b) Kolon kromatografisi:

- Gaz kromatografisi (GC)
- Sıvı kromatografisi (LC)
- Yüksek verimli sıvı kromatografisi (HPLC).

2.3.3.2 Proteinlerin yapılarının belirlenmesi

Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometreleri genel bir ifadeyle, manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışan tekniklerdir.

Proteinlerin kütle spektrometresi ile tanımlanması karışımdaki bireysel peptitlerin ölçülen kütleleri ve bir proteinde bulunduğu düşünülen teorikçe türetilmiş peptit kütleleri ile kıyaslama vasıtası ile gerçekleştirilir. Proteinlerin ve peptitlerin kütle spektrometrelerinde; genelde peptit dizi analizleri, protein tanımlanması ve haritalama, moleküler kütle ve özellikle post translasyonel modifikasyonların belirlenmesi esastır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan sistemler; MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight), (ESI-TOF, Elektro Spray Ionization Time Of Flight), (PSD-MALDI-MS, Post Source Decay) ve (SELDI-TOF, Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) olarak sıralanır (Biberoğlu, 2003).

2.3.3.3 Veritabanlarının kullanılması

Biyoinformatik genel olarak biyolojik problemlerin çözümünde bilişim teknolojilerinin kullanılması olarak tanımlanabilir.

Bilgisayarların moleküler biyolojide kullanımı üç boyutlu moleküler yapıların grafik temsili, moleküler dizilimler ve üç boyutlu moleküler yapı veritabanları oluşturulmasıyla başlamıştır. Kısa sürede çok yüksek miktarda veri üreten, endüstri düzeyinde gen ekspresyonu, protein-protein ilişkisi, biyolojik olarak aktif molekül araştırmaları, bakteri, maya, hayvan ve insan genom projeleri gibi biyolojik deneylerin doğurduğu talep bu alanda gelişmeleri hızla arttırmıştır.

Biyoinformatik, modern biyolojinin 2 temel bilgi akışını kapsar;

1-Genetik Bilgi Akışı: bir organizmanın DNA'sı incelenerek özelliklerinin belirlenmesinden, incelenen bu organizma türünün oluşturduğu toplulukların karakteristik özelliklerine kadar olan bilgi akışı. Elde edilen DNA bilgisi tekrar genetik havuzun tanımlanması için kullanılır.

2-Deneysel Bilgi Akışı: biyolojik olaylar gözlenerek elde edilen bilgi, açıklayıcı modeller ile tarif edilir, daha sonra bu modellerin doğruluğu yeni deneyler ile test edilir.

Biyoinformatik araçların kullanıldığı genel biyolojik çalışmalardan bazıları aşağıdaki gibidir;

- Protein yapı ve fonksiyonunun belirlenmesi
- Herhangi bir biyolojik fonksiyonu artıran veya engelleyen küçük moleküllerin tasarlanması
- Karmaşık genetik fonksiyon ya da düzenleyici faaliyetlerinin tanımlanması
- Tıbbi ya da endüstriyel amaçlı yeni makromoleküller üretmek
- Genetik faktörlerin, hastalık yatkınlığına etkilerini ortaya çıkarmak

Yapılan dizi analizi çalışmaları, yeni genlerin bulunması, genlerin yapı analizinden fonksiyonlarının tayini ve bir genin yapısındaki değişimin hastalıklarla ilişkisinin araştırılmasında fayda sağlar. Moleküler modelleme çalışmaları ise; bir proteinin üç boyutlu yapısının, fonksiyonu ile nasıl bir bağlantısının olduğunu anlamaya yardımcı olur. Günümüzde Biyoinformatik, insan genomundaki genlerin dizilim analizlerinin yapılması ve haritalanmasından elde edilen yeni bilgilerin analizlenmesi ile yoğun olarak uğraşmaktadır. Yapılan bu çalışmalarla elde edilen bilgiler değişik genetik ve diğer hastalıkların daha iyi anlaşılmasına ve yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesine fayda sağlayacaktır. Sonuç olarak Biyoinformatik; ilaç tasarımı, gen terapisi, diagnostik tarımsal rekolte (1 yıllık ürün), biyokimyasal

işlemler gibi önde gelen biyoteknoloji alanlarında uygulama bulan bir disiplin olarak kendisini gösterir.

Milyonlarca nükleotidin depolanması ve organizasyonu için veritabanlarının oluşturulması, araştırmacıların bu bilgilere ulaşabilmesi ve yeni veriler girebilmeleri için ilk aşamadır. Biyoinformatikte **nükleotid** dizi bilgilerinin organizasyonu ve depolanması görevini üstlenmiş 3 kuruluş vardır.

1. GenBank (Gen Bankası- ABD, Maryland' da)
2. EMBL (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı –İngiltere, Hinxton'da)
3. DDBJ (DNA Japonya Veritabanı – Japonya, Mishima'da)

Bu 3 kuruluş araştırmacıların faydalanmasına açıktır ve nükleotid dizi bilgilerinin toplanması ve dağıtılmasında işbirliği içinde çalışmaktadır.

Protein dizi verileri ile ilgili başlıca hizmet sağlayanlar ise;

- GenBank
- EMBL
- PIR İnternational (Protein Identification Resource)
- Swiss-Prot'tur.

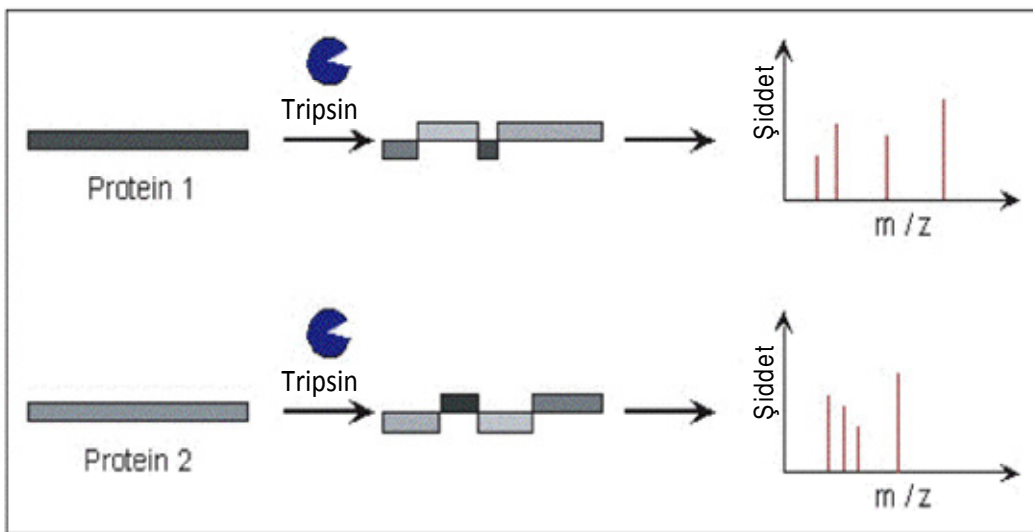
Dizi bilgileri, veritabanlarında iki formda bulunur. Bunlardan birincisi; diziyi veritabanına ilk işleyenler, kaynak gösterimleri, biyolojik atıflar ve dizinin kendisiyle; intronlar, eksonlar, başlangıç ve bitiş kodonları v.b. bilgiyi içeren bir tablodan oluşan tam bilgidir. İkincisi ise; hızlı benzerlik araştırmaları için kullanılan ve sadece diziyi içeren **FASTA** formatıdır. Her bir diziyi belirleyen ve dizi veritabanına ilk kez girildiğinde verilen erişim numaraları özgün kimliklerdir. Dizi bilgileri patent ofisleri gibi çeşitli kaynaklardan veritabanına ulaşır.

2.3.4. MALDI-MS / PMF (Peptit Kütle Parmakizi) yöntemi

Protein kimyasına, kütle spektrometresinin girişinden sonra peptit kütle parmakizi (PMF) analizi, yüksek verimle gerçekleştirilen bir protein tanımlama yöntemi oldu. Bu yaklaşımda, 2-D jel elektroforez ile saflaştırılan proteinler enzimatik ya da kimyasal olarak parçalanır ve elde edilen peptit karışımı kütle spektrometresi ile analiz edilir. Daha sonra elde edilen peptit kütle parmakizi, veri tabanlarında depolanan teorik olarak türetilmiş peptit kütleleriyle karşılaştırılır. ESI gibi diğer iyonlaştırma tekniklerine nazaran (Fenn ve ark., 1989) MALDI, çok aşırı olmaması

şartıyla analit içerisinde bulunabilecek tuz ve tampon konsantrasyonlarını tolere eder. MALDI tekniğinde tek yüklü iyonlar oluşur. Bu tür sebepler MALDI tekniğinin, peptit kütle parmakizi (PMF) analizlerinde tercih edilen iyonlaşma tekniği olmasına neden olmuştur. 1990'ların başında birçok araştırma grubu, proteinlerin MALDI-PMF yöntemiyle tanımlanması konusunda çalışmalar yayınlamıştır (James ve ark., 1993; Mann ve ark., 1993). Literatürde var olan çalışmalar da gösterdi ki, çok küçük miktarlarda peptit örneklerinin bile kütleleri çok büyük bir doğrulukla ölçülebilmektedir (Gheyi, 2005).

Burada bir kısıtlama olarak söylenirse 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 getirilememesi ve son derece karışık bir spektrum üretmesidir. Bu amaçlar doğrultusunda proteinleri peptit fragmanlarına parçalamak için en çok kullanılan yöntem tripsin ile parçalama işlemidir. Veri tabanlarının birbiri ile tutarlılığını sağlamak ve böylece karşılaştırma kolaylığı yaratmak amacıyla da genellikle tripsin kullanılır. Tripsin iki farklı bölgeye özgüdür Arginin-C ve Lisin-C (Arg-C ve Lys-C). Yani polipeptit zincirinde her arginin ve lisin aminoasidinin C-terminalindeki aminoasit ile arasındaki bağı hidroliz eder. Ayrıca fiziksel dayanımlı olup kolay bir kullanım sağlar (Gevaert ve Vandekerckhove, 2000).



Şekil 2.22. Peptit kütle parmak-izi analizi için tripsin enzimi ile protein parçalanması.

Günümüzde bir çok araştırma grubunun çalışmaları sonucu elde edilmiş olan ve teorik olarak türetilen peptit kütle parmakizi verileri bulunmaktadır. Bu veritabanı arama motorlarına;

MOWSE (<http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/mowse>)

ProtFound (<http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>),

Peptident (<http://www.expasy.ch/tools/peptident.html>) ve

PeptideSearch(http://peptsearch.protana.-com/FR_PeptideSearchForm.html)

örnek verilebilir. MALDI-PMF yönteminin başarısı, bu veritabanlarındaki karşılaştırmalarla gösterilmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Sığır Serum Albumin (BSA) proteini, Qbiogene (Amerika), Tripsin (sığır pankreasından, E.C. 3.4.21.4, 14,100 U/mg) enzimi Sigma (Steinheim, Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Sitokrom C ve ubiquitin proteinleri, Acros Organics (Amerika) den temin edilmiştir. Metanol ve Amonyum bikarbonat Sigma (Steinheim, Almanya) firmasından alınmıştır. Sodyum florür (NaF), Tetrametilortosilikat (TMOS), Tetraetilortosilikat (TEOS), Aldrich (Almanya), Tetrahidrofuran (THF) ve Asetonitril (ACN), Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından alınmıştır. Trifloroasetik asit (TFA) çözeltisi ve etanol Riedel-de Haen (Almanya) den satın alınmıştır. Polietilen Glikol (PEG1000 ve PEG 6000) Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Bütün deneylerde deiyonize su kullanılmıştır.

α -Siyano-4-Hidroksi-Sinamik asit (CHCA) MALDI matriksi Fluka (Buchs, İsviçre), Sinapinik asit (3,5-Dimetoksi-4-hidroksisinamik asit (SA)) MALDI matriksi, Acros Organics (New Jersey, Amerika) den alınmıştır.

Jel elektroforez için kullanılan, Akrilamid, Bisakrilamid (N-N'-metilen bisakrilamid), Tris baz, Amonyum persülfat (APS), gliserol, Coomassie Brilliant Blue R250 Boyama Çözeltisi, TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin), DTT (Ditiyotreitöl), İyodoasetamid kimyasallarının tamamı, Mini-PROTEAN® 3 Cell sistemi ile birlikte BIO-RAD (California, Amerika) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Tripsin Tutuklanmış Sol-Jellerin Sentezi

Öncelikle 1 mL su içerisinde, 2 mg/mL derişiminde tripsin çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti, 0.1 mL 20 mM NaF (sodyum florür) katkı maddesi ile karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma, 0.6 mL metanol eklendikten sonra 4 °C' ye soğutuldu. Son olarak, 1 mL TEOS (Tetraetilortosilikat) başlatıcı maddesi (prekürsor) eklendi. Bu reaksiyon karışımı, çalkalayıcılı su banyosunda oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi ve polimerleşme gerçekleşinceye kadar yaklaşık olarak 2-4 saat arasında çalkalayıcılı su banyosunda karıştırıldı. Polimerleşen sol çözeltisi, 1 ile 2 hafta arası bir periyotta 30 °C' de kurutuldu.

Farklı başlatıcı madde kullanımının denenmesi amacıyla yapılan çalışmalar doğrultusunda, sentez işlemi TEOS (Tetraetilortosilikat) yerine TMOS (Tetrametilortosilikat) başlatıcısı kullanılarak tekrarlandı.

Tripsinin tutuklanabilirliğini ve tripsin tutuklanması sonucunda jelin por (gözenek) yapısında meydana gelebilecek değişimleri gözleyebilmek için, tripsin tutuklanmamış boş bir TEOS jeli kontrol amacıyla sentezlenmiştir. Bu işlemde, önce 0.1 mL 20 mM NaF (sodyum florür) ile 0.6 mL metanol karıştırıldı ve karışım 4 °C' ye soğutuldu. Daha sonra 1 mL TEOS (Tetraetilortosilikat) başlatıcı maddesi (prekürsor) eklendi ve reaksiyon karışımı, çalkalayıcı su banyosunda polimerleşme gerçekleşinceye kadar yaklaşık olarak 2-4 saat arasında karıştırıldı. Polimerleşen sol çözeltisi, 1 ile 2 hafta arası bir periyotta 30 °C' de kurutuldu (Avnir, 1997).

3.2.1. Alkol miktarı değişiminin etkisi

Alkol miktarı değişiminin, sol-jellerin yapısı ve tripsinin tutuklanması üzerindeki etkilerini inceleyebilmek amacıyla 0.6 mL metanol kullanılarak yapılan sentez çalışması, başka bir parametre değiştirilmeksizin farklı metanol miktarlarında tekrarlandı. 0.4 mL metanol ve 0.2 mL metanolün kullanıldığı iki farklı sol-jel daha aynı yöntemle sentezlendi.

3.3. Karakterizasyon

3.3.1. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopi

Sentezlenen çeşitli sol-jellerin ve tripsin enziminin FTIR spektrumları, bir Fourier Transform İnfrared spektrometresi (Spectrum One B, Perkin Elmer, USA) kullanılarak elde edilmiştir.

3.3.1.1. FT-IR örneklerinin hazırlanması

Sentezlenen sol-jellerin yapısal karakterizasyonu için, yaklaşık 10 mg kurutulmuş ve ince toz haline getirilmiş örnek (TEOS sol-jelleri ve tripsin standartı) 100 mg KBr ile karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Daha sonra bu karışım, tablet şekline getirilmek için preslenip, 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrumları alınarak kaydedilmiştir.

3.3.2. Taramalı Electron Mikroskopisi (SEM)

Sentezlenen sol-jellerin yüzey morfolojilerini incelemek amacıyla, Taramalı Elektron Mikroskobu (JEOL, JSM 6330, Japan) kullanılmıştır.

3.3.2.1. SEM örneklerinin hazırlanması

Sentezlenen sol-jel örnekleri, oda sıcaklığında kurutulmuş ve yüzeyleri vakum altında ince altın tabakası ile kaplanmıştır. X800, X1000, X1500 gibi çeşitli büyütme oranlarında elektron mikroskobu ile fotoğrafları alınmıştır.

3.3.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Sol-jellerin ısısal kararlılıklarının incelenmesi Perkin Elmer Pyris model Termogravimetrik Analiz (TGA) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Toz halindeki sol-jel örnekleri termal analizörün platin kefesine yaklaşık 5-10 mg kadar konup, 25°C'tan başlayarak 800°C'a kadar ısıtılmış ve sıcaklıkla azalan % ağırlık değişimi kaydedilmiştir. Çalışmalar azot gazı atmosferinde ve 10°C/dak ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, TGA termogramları ve bu termogramların türevleri alınarak DTG eğrileri şeklinde değerlendirilmiştir (Kavaklı, 2001).

3.4. Tripsin Tutuklanmış Sol-jellerin Proteomiks Çalışmaları İçin Kullanımı

Tripsin immobilize edilmiş sol-jeller, proteinlerin "peptid kütle parmakizi" analizlerinin gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla, sol-jel içerisine tutuklanmış tripsin enzimi ile, proteinlerin peptid fragmanlarına parçalanması sağlanmıştır. Bu çalışmalarda öncelikle 1 mg/mL derişiminde protein örneğinden 10 µL (BSA, Sitokrom C ve Ubiquitin proteinleri kullanılmıştır) alındı ve 1 µL, 1 M amonyum bikarbonat çözeltisi ile karıştırıldı. Daha sonra tripsin tutuklanmış sol-jellerden 2 mg alınarak, bu tampon-protein karışımına eklendi. Bu karışım, protein örneğinin parçalanması için, 37°C'de 2 saat inkübe edildi. 2 saatin sonunda, proteinin parçalanması sonucu oluşan peptid çözeltisi, sol-jel materyalinden ayrıldı ve MALDI analizi için 4°C'de saklandı. Bu kullanılan sol-jel bir kaç defa deiyonize su ile yıkandı ve hem peptid çözeltisinin, hem de yıkama çözeltilerinin analizi MALDI-MS yöntemiyle gerçekleştirildi.

3.4.1. Diğer protein parçalama (Digestion) yöntemleri

3.4.1.1. Proteinlerin çözeltide parçalanması

10 µL protein örneği, 1µL NH_4HCO_3 ile karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma, 1 µL tripsin çözeltisi eklendi ve proteinlerin parçalanma işlemi başlatıldı. Çözelti 2 saat, 37°C'de karanlıkta inkübe edildi. 10 µL, %10'luk TFA çözeltisi ile proteinlerin parçalanması işlemi durduruldu.

3.4.1.2. Proteinlerin Poli-akrilamid jel içerisinde parçalanması

Mini-PROTEAN® 3 Cell sistemi kullanılarak Poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle ayrılmış proteinlerin jel içerisinde parçalanması işlemi de tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Jellerin protein kısımları kesilip, jeller küçük parçalara ayrıldı ve eppendorflara konuldu. 100 µL (25 mM , 50 mL NH_4HCO_3 , %50'lik Asetonitril (ACN) içerisinde) çözeltisinden jellerin tamamını kaplayacak kadar eklendi. Çok düşük bir hızda 35-40 dakika yavaşça çalkalandı. Sonra çözücü uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi en az 3 kez tekrarlandı. Jellerden, Commassie Brilliant Blue tamamen giderilecek şekilde 100 µL ACN ile yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem, jeller opak beyaz olana kadar tekrarlandı. ACN'nin tamamen uzaklaştırılması için jeller, 3-5 dakika santrifüjlenip, kurutuldu. Bu aşamadan sonra proteinin içerdiği sistein kalıntılarını uzaklaştırmak için bir dizi işlem uygulamak gereklidir. Bunun için, jellere 30 µL 10 mM DTT eklendi ve 30-45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra DTT jellerden uzaklaştırıldı. 30 µL 5 mM iyodoasetamid eklendi. 45 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İyodoasetamid çözeltisi uzaklaştırıldı ve jeller yaklaşık 100 µL 25 mM NH_4HCO_3 ile vorteksenerek yıkandı. NH_4HCO_3 çözeltisi atıldı ve jeller yaklaşık 100 µL ACN ile yıkandı. Bu işlem jeller opak beyaz olana kadar tekrarlandı. ACN uzaklaştırıldı ve jeller vakum santrifüjde 3-5 dakika kurutuldu.

Poliakrilamid jel içerisindeki protein örneklerinin parçalanması işlemine jel parçalarına, 25 µL tripsin eklenerek başlandı ve buzda 15 dakika bekletildi. Daha sonra fazla tripsin çözeltisi atıldı ve jeller 30 µL, 25mM NH_4HCO_3 ile kaplandı. 12-16 saat 37°C'de inkübe edildi. Protein örneklerinin parçalanması durdurmak için jellerin üstünü kaplayacak kadar % 5'lik TFA çözeltisi eklendi. Jel parçalarını

içeren eppendorflar 10 dakika çalkalandı. Daha sonra, sıvıyı tüpün dibine toplamak için kısa bir süre santrifüjlendi. Bu aşamadan sonra oluşan peptid parçalarına daha etkin bir şekilde elde edebilmek için Zip-Tip Protokolü uygulandı. Bu protokole göre önce, CHCA matriks çözeltisinden 10µL örnek sayısı kadar eppendorflara ayrıldı. Otomatik pipet 10 µL'ye ayarlanarak ucuna zip-tip takıldı. ACN 1:1 %0.1 TFA (su içinde) çözeltisi ile şartlandırmak için pipet ucuna 3 kez çekip bırakıldı. Daha sonra bir önceki basamaktan farklı olarak otomatik pipet yine 10 µL'ye ayarlı kalacak şekilde, bu seferde % 0.1 TFA (su içinde) çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Daha önce santrifüjlenerek tüpün dibine indirilen çözelti, proteinlerin parçalandığı çözeltidir. Bu çözelti en az 10 kez zip-tip çekilip bırakıldı. Proteinin parçalanma ürünü olan peptidler bu basamakta, zip-tip ucundaki partiküllere bağlanır. Zip-tip içindeki partiküllere bağlanmış olan peptidler, 10 µL % 0.1 TFA (su içinde) çözeltisi ile 2 kez yıkandı. Daha önceden örnek sayısı kadar hazırlanan 10 µL' lik matriks çözeltisi 3 kez zip-tipe çekilip bırakıldı. Bu işlem sonrasında 4. kez örnek çekilerek direkt MALDI plate'i üzerine spotlandı.

3.5. MALDI-Kütle Spektrometresi

Tüm kütle spektrumları, Voyager-DE™ PRO MALDI-TOF kütle spektrometresi (Applied Biosystems, Amerika) ile alınmıştır. Sistemde 337 nm dalga boyunda çalışan azot lazeri (Spectra Physics, USA) kullanılmış ve lazer şiddeti de gerekli oldukça değiştirilmiştir. İyonlara yaklaşık 20 kV kadar bir hızlandırma potansiyeli uygulanmıştır. Bütün analizler esnasında sistemdeki vakum 10^{-8} torr gibi, analizler için oldukça elverişli bir düzeyde tutulmuştur. Spektrumlar lineer modda alınmıştır. Ayrıca refletron modda da (yüksek ayırıcılıklı spektrumların elde edilmesi için) alınmış spektrumlar bulunmaktadır. Kütle Spektrumları yaklaşık 50 lazer vuruşu sonucu elde edilmiş ve kütle hatalarını düzeltmek için anjiyotensin (1296.5 g/mol), insülin (5733.5 g/mol) ve bradikinin (1060.2 g/mol) ile kütle kalibrasyonu uygulanmıştır. Son olarak spektrumlar bilgisayara kaydedilmiştir.

3.5.1. MALDI örneklerinin hazırlanması

Tüm çalışmalarda kullanılan protein ve peptidlerin analizleri için MALDI matrikslerinden α-Siyano-4-hidroksisünamik asit (HCCA) (1:1 su-asetonitril %0.1 TFA karışımında, 10 mg/mL) ve sinapinik asit (1:1 su-asetonitril, %0.1 TFA

karışımında 10 mg/mL) olarak hazırlanmıştır. MALDI örnekleri matriks çözeltileri ile 1:10 (hacim/hacim) oranında karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra MALDI örnek tutucularındaki her bir spota 0.5 ile 1.0 µL arasında uygulanıp açık atmosferde kurutulduktan sonra MALDI-Kütle Spektrometresi ile analiz edilmiştir. Gerek proteinlerin MALDI-Kütle Spektrometresi ile analizlerinde gerekse tripsin enzimi ile proteinlerin parçalanmalarından sonra MALDI-Kütle Spektrometresi analizlerinde protein çözeltilerinin başlangıç derişimleri 0.2-1.0 mg/mL aralığında tutulmuştur.

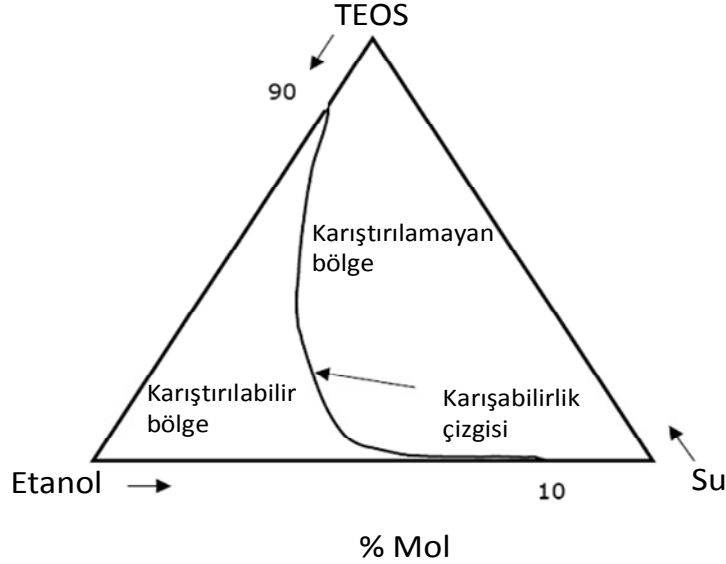
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Literatür çalışmalarından da bilindiği üzere sol-jel sentezi, çok çeşitli başlatıcı türleri, asit veya baz katalizörleri, farklı alkol çeşitleri gibi birçok değişkenin, en uygun miktarlarda ve şartlarda kullanılması ile gerçekleştirilen ve bir dizi basamaktan oluşan bir malzeme sentez yöntemidir. Elde edilen ürünler, çok çeşitli amaçlar doğrultusunda birçok uygulama alanına sahiptir. Bu uygulama alanlarından biri de, biyomolekül tutuklanmış sol-jellerin, proteomiks çalışmalarında kullanımıdır. Sol-jel yöntemiyle sentezlenen materyallerin, geleneksel organik polimerlerle kıyaslandığında sağladıkları; mekanik ve ısısal kararlılıklarının yüksek oluşu, kimyasal ve biyolojik degradasyona daha dirençli olmaları, sentez işlemlerinin kolay ve oldukça ılımlı koşullarda gerçekleştirilebilmesi ve tutuklanan biyomolekülün biyolojik aktivitesini uzun süre koruyabilmesi gibi çok önemli avantajlar nedeniyle bu çalışmanın çıkış noktasını oluşturmuştur (Brinker ve Scherer, 1990). Farklı başlatıcı maddesi, farklı katalizör ve değişik miktarlarda alkol kullanılarak sentezlenen bir dizi sol-jel materyaline tripsin tutuklanması işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürünler, MALDI-MS tekniği kullanılarak, proteomiks çalışmalarının en etkin yollarından birisi olan, proteinlerin peptit kütle parmakizi analizlerinin elde edilmesinde kullanılmıştır (Mann ve ark., 1993). Yapılan sentez çalışmaları belirli bir sistematik çerçevesinde, başlatıcı madde etkisi, alkol ve katalizör değişimlerinin peptit kütle parmakizi analizine ve sentezlenen sol-jellerin gözenek ve yüzey yapılarına etkileri incelenecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, iki farklı başlangıç maddesi kullanılarak, sol-jel malzemeleri hazırlanmıştır. Bu materyallerin hazırlanışları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sol-jel sentezinde başlatıcı madde değişimi

Başlatıcı Madde	Alkol	Katalizör	Enzim
TEOS (1) (1 mL)	Metanol (0.6 mL)	NaF (20 mM 0.1 mL)	Tripsin (1 mL 2mg/mL)
TMOS (1 mL)	Metanol (0.6 mL)	NaF (20 mM 0.1 mL)	Tripsin (1 mL 2mg/mL)

Çalışmalarda kullanılan TEOS ve TMOS metal alkoksitleri, suda çözünmeyen başlatıcılardır. Su ve alkoksitler birbirlerine karışmadığı için, ortak bir çözücü olarak uygun bir alkol kullanılması gerekir. Bu homojenleştirme reaktifi alkolün varlığında, alkoksit ve suyun karışabilmesinden dolayı hidroliz kolaylaşır ve bu da hidroliz reaksiyonunun hızının artması anlamına gelir.



Şekil 4.1. Sol-Jel başlatıcılarının karışabilirliğini gösteren üçlü-faz diyagramı (Brinker ve Scherer, 1990).

Sol-jel sentezlerinde, alkol türü ve miktarı, su miktarı, katalizör tipi ve sıcaklık faktörleriyle birlikte hidroliz tepkimesi hızını etkileyen önemli faktörlerdir. Bu faktörler, hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonlarını etkilemekle birlikte, sonuçta oluşacak jel yapısının partikül ve gözenek büyüklüklerinde de farklılıklar meydana getirmektedir. Çeşitli çalışmalar, kullanılan alkolün molekül ağırlığının artırılmasıyla jeldeki partikül büyüklüğünün arttığını göstermektedir (Sadasivan ve ark., 1998; Harris ve ark., 1990).

Çizelge 4.2’de gösterilmiş olan deneyde ise TEOS monomerinin başlatıcı olarak kullanılmasıyla üç farklı sol-jel materyali sentezlenmiştir. Bu aşamada yapılan sentezlerde yalnızca alkol miktarları değiştirilmiş ve diğer deneysel parametreler sabit tutulmuştur. Üç farklı sol-jel içinde, 1 mL TEOS, 1 mL 2mg/mL tripsin çözeltisi ve 20 mM 0.1mL NaF kullanılmıştır ve sadece kullanılan metanol hacmi

değiştirilmiştir. Sentezlenen bu materyaller **TEOS1**, **TEOS2** ve **TEOS3** kısaltmaları şeklinde isimlendirilmiştir ve analizlerde bu isimlendirmeler kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. Alkol miktarı değişimine bağlı olarak sentezlenen sol-jeller.

Başlatıcı Madde	Metanol miktarı (mL)
TEOS (1)	0.6
TEOS (2)	0.4
TEOS (3)	0.2

Bu çalışmada alkol miktarının gözenek büyüklüğüne etkileri, tutuklanan tripsin enziminin aktivitesine etkileriyle, yani bir başka deyişle peptid kütle parmakizi analizlerinde ortaya çıkan değişikliklerle etkilerinin incelenmesi amacı ile bu tür sol-jel malzemeleri sentezlenmiştir. Farklı alkol miktarları kullanılarak sentezlenen jeller için, Taramalı elektron Mikroskopisinde (SEM) farklı yüzey özellikleri saptanmıştır. Ayrıca tripsin tutuklanmış bu sol-jellerle yapılan enzimatik parçalama deneyleri sonucunda aynı proteinlerin farklı peptit türlerine parçalandıkları gözlenmiştir. Bu farklılıklarda alkol miktarına bağlı olarak jelin gözenek yapısında değişiklik meydana geldiğini ve tripsin enziminin tutuklanabilirliğine ve tutuklanan enzimlerin yararlanılabilirliğine etki ettiğini göstermiştir. Tripsinin, en iyi TEOS1 jeline enzimatik etkinliğini koruduğu, BSA proteinin enzimatik parçalanması sonucu oluşan peptitlerin, MALDI-MS'de incelenmesiyle görülmüştür.

Çizelge 4.3'de gösterilmiş olan sentez çalışmalarında ise alkol türünün değişiminin sol-jel yapısında meydana getireceği farklılıklar belirlenmeye çalışılmıştır. Su ve sol-jel başlatıcı moleküllerinin karışabilirliğini sağlamak için metanol yerine, organik bir polimer olan Polietilen Glikol (PEG) kullanılmıştır. Yapılan bu sentezlerde elde edilen jellerin, bir inorganik-organik hibrit materyali oldukları değerlendirmesi yapılabilir. Bu çerçevede molekül ağırlıkları farklı iki Polietilen Glikol (PEG) molekülü ve farklı miktarlarıyla denemeler yapılmıştır. Başlatıcı madde olarak TEOS ve TMOS molekülleri kullanılmıştır. Çeşitli denemeler sonucu elde edilen jellerde, PEG katkı maddesinin molekül ağırlığının ve miktarının değişimine paralel

olarak, sentezlenen jellerin gözenek yapılarında ve boyutlarında farklılıklar olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.3. Polietilen Glikol etkisi (Burada sentezler; Her bir sol-jel materyali için; 1 mL başlatıcı madde, 1 mL 2mg/mL tripsin çözeltisi ve 20 mM 0.1 mL NaF kullanılarak gerçekleştirilmiştir).

Kısaltma	Başlatıcı maddesi	PEG1000 (mL)	PEG6000 (mL)
PEG1	TMOS	0.6	-
PEG2	TMOS	-	0.1
PEG3	TEOS	0.6	-
PEG4	TEOS	-	0.1
PEG5	TMOS	0.1	-
PEG6	TMOS	-	0.6
PEG7	TEOS	0.1	-
PEG8	TEOS	-	0.6

Burada sol-jel materyalinin gözenekliliğinin ve özellikle mikrogözenek yapılarının farklılaşmasında, başlatıcı maddesi ve PEG katkı maddesi arasındaki etkileşim anahtar rol oynamaktadır. Bu etkileşim, kurutma ve ısıtma esnasında meydana gelen Si-O-Si bağının oluşumunu kısıtlar ve mikrogözenek yapısını değiştirir. PEG molekülleri ve sol-jel başlatıcı moleküllerinin hidrolizi sonucu oluşan silanol grupları arasında meydana gelen iki çeşit etkileşim vardır. Birincisi; silanol ve PEG molekülünün sondaki hidroksi grubunun etkileşmesiyle meydana gelen ester bağı (Si-OR) oluşumu, ikincisi ise; silanol ve PEG molekülündeki eter oksijenleri arasında meydana gelen hidrojen bağı oluşumudur. Bu iki etkileşimin kombinasyonu, jeldeki mikrogözenekliliğin farklılaşmasına neden olur. PEG'ün molekül ağırlığının artışıyla, birinci etkileşim hızla kaybolur ve hidrojen bağı oluşumu daha güçlü hale gelir. Literatürde bulunan bazı çalışmalarda, bu etkinin sonucu olarak mikrogözenekliliğin arttığı gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 2000). Bu kısımdaki deneylerde, PEG türü ve miktarının, sentezlenen jellerin

mikrogözeneklilikleri üzerine etkileri araştırıldı ve aynı zamanda bu jellere tutuklanan tripsinin etkinliği incelenerek, en uygun katkı maddesi ve oranı belirlenmeye çalışıldı. Sonuç olarak, sentezlenen sekiz ayrı sol-jel materyalinin, proteinlerin tripsin ile parçalanması işlemlerinde kullanıldığında en iyi sonuçların PEG8 sol-jelinde elde edildiği ve bazı jellerin hiç kullanılmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar aşağıdaki bölümlerde verilmiştir.

Deneysel çalışmaların bütününde, sol-jel sentezlerini tasarlarken temel bazı özellikler ve zorunluluklar göz önünde bulundurulmuştur. Malzeme biliminin ilgilendiği geleneksel sol-jel sentezlerinde kurutma ve yaşlandırma basamaklarında sıcaklık artırılabilir. Ancak biyomolekül tutuklanmış sol-jellerin sentezinde, immobilize edilen biyomolekülün bozunmaması için yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen işlemlerden kaçınılması gerekir. Tripsin tutuklanmış sol-jel materyallerinin sentezinde, enzimin bozunmaması ve etkinliğini kaybetmemesi için işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

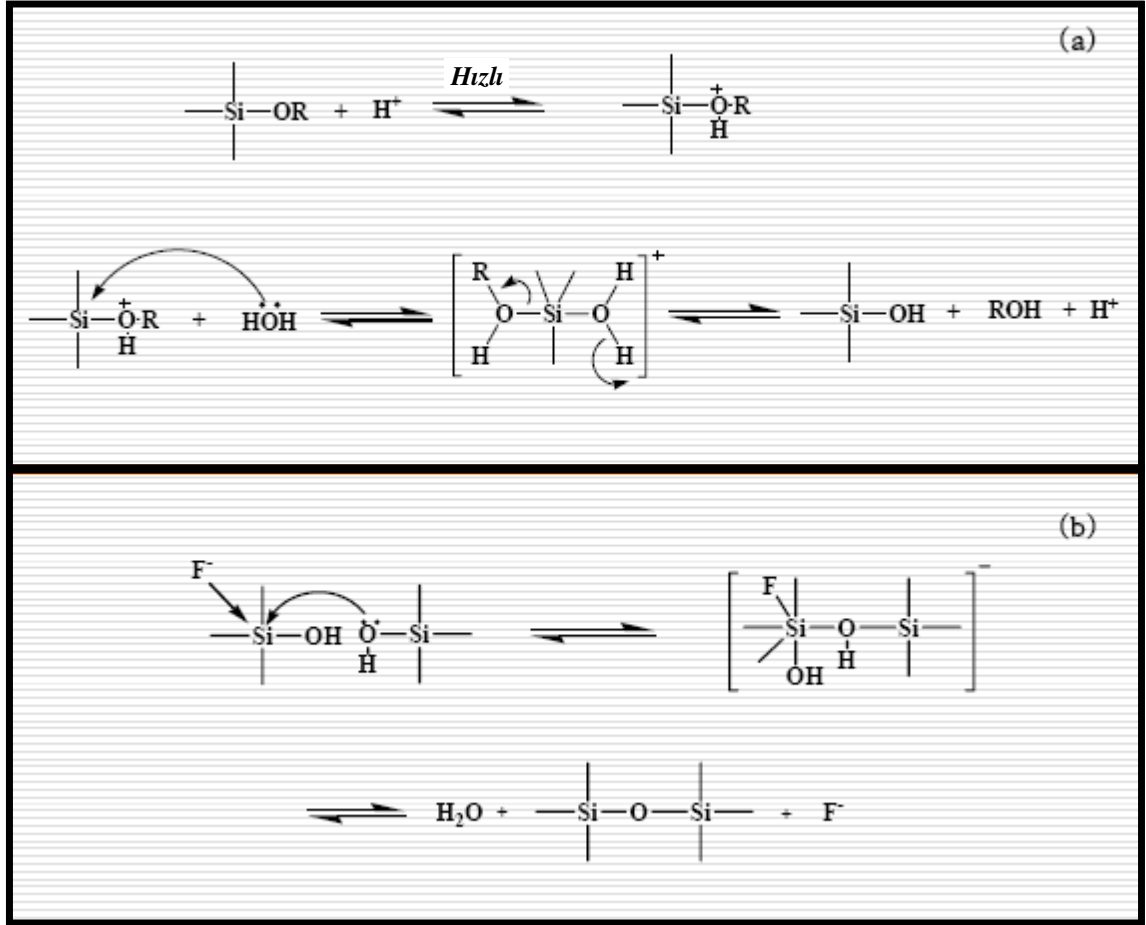
Göz önünde bulundurulması gereken diğer bir önemli özellik ise, yine tutuklanan tripsin enziminin denaturasyonuna neden olabilecek pH parametresinin ayarlanmasıdır. Tripsin enzimi yaklaşık pH=8 ortamında uygun olarak çalışabilir. Dolayısıyla hidroliz reaksiyonunu katalizlemek için kullanılabilecek asit veya bazların seçilmesi tripsinin etkinliğini kaybetmemesi için dikkat edilmesi gereken bir deneysel parametredir. Ortamın pH'ına bağlı olarak tripsinin, proteinlerin parçalanması işlemlerinde kullanılabilmesi ve yüksek etkinlik göstermesi için sol-jel sentezinde pH'ın çok yüksek ya da çok düşük olmaması gerekir.

Çizelge 4.4. Katalizör değişimi (Bu aşamada sentezler; 1 mL TEOS, 1 mL 2 mg/mL tripsin çözeltisi ve 0.6 mL metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir).

Başlatıcı Madde	Katalizör (20 mM , 0.1 mL)
TEOS (1)	NaF
TEOS (4)	NaOH

Sol-jel işlemlerinde kondenzasyon basamağını etkileyen en önemli faktörler; sıcaklık, pH, reaksiyon süresi, katalizör ve miktarı, yaşlandırma sıcaklığı ve

süresidir. Şekil 4.2’de asit katalizli ve NaF katalizli reaksiyonlar görülmektedir. Sol-jel sentezlerinde asit katalizörü yerine baz katalizörünün kullanılması, kondenzasyon reaksiyonlarını hidroliz reaksiyonlarına göre daha istemli hale getirir. Kondenzasyon reaksiyonunun hızlı olması nedeniyle de gözenek büyüklükleri artar ve bu etki sonucu kurutma esnasında meydana gelebilecek olası kırılmalar azalır. Ayrıca jelleşme esnasında kondenzasyonun, hidrolizden daha istemli olması, monomerlerin agregasyonuna (toplanma,kümelenme) neden olur ve yapı daha kompakt (sıkıştırılmış, yoğun) ve dallanmış bir ağ şeklini alır.



Şekil 4.2. Sol-jel işlemi a) Asit katalizli b) NaF katalizli.

Lewis bazı olan sodyum florür (NaF), tüm bu etkilerle birlikte yüksek pH’da tripsin üzerinde meydana gelebilecek olumsuz etkileri engellemek için kullanılmıştır.

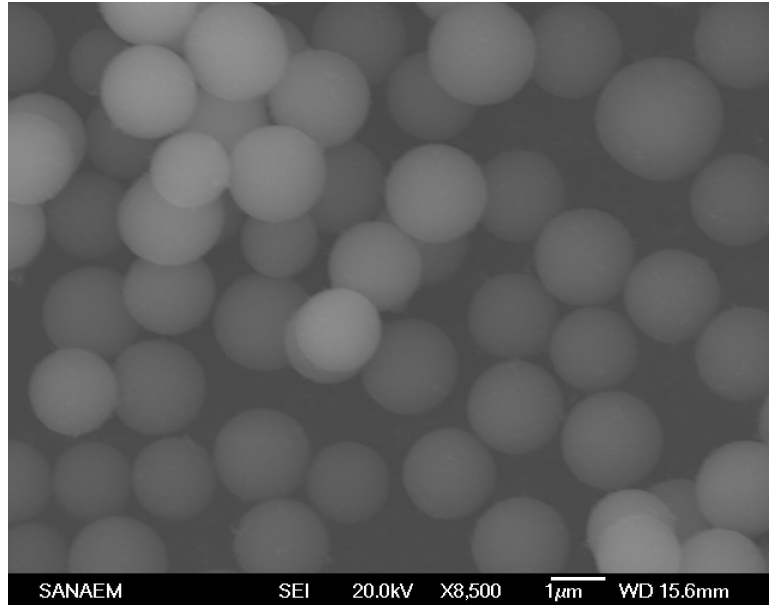
4.1. Karakterizasyon

Yukarıdaki bölümde de bahsedildiği gibi sol-jel sentezinde elde edilecek materyalin fiziksel özellikleri birçok parametre tarafından kontrol edilmektedir.

Bununla birlikte sol-jel sentezi sırasında sol-jel içerisindeki ağ yapısında tutuklanacak olan biyomolekölün uygun şartlarda tutuklanıp tutuklanmadığını izleyebilmek için değişik karakterizasyon yöntemleri uygulanmıştır. Sırası ile SEM, FT-IR, TGA yöntemleri uygulanmış ve sentezlenen sol-jel materyalinin özellikleri ve uygunluğu araştırılmıştır.

4.1.1. SEM analizi

Öncelikle TEOS başlatıcı maddesi kullanılarak enzim (tripsin) tutuklanmamış sol-jel ve enzim tutuklanmış TEOS sol-jelinin SEM görüntüleri alınmıştır ve bu SEM elektron mikrograflarından yararlanarak bu jellerin, yüzey morfolojilerindeki değişikliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Aynı şekilde TMOS başlatıcı maddesi kullanılarak enzim tutuklanmış sol-jel sentezlenmiş ve SEM görüntüsü enzim olmayan sol-jel materyali ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Şekil 4.3’de görüldüğü üzere enzim tutuklanmamış TEOS sol-jelinde, partikül büyüklükleri birbirine çok yakın (yaklaşık 800 nm) ve düzgün kürelerin oluştuğu tespit edilmiştir. Burada sentezlenen sol-jellerin boyutları sıcaklığın değiştirilmesi ve başlatıcı miktarının değiştirilmesi ile daha küçük ve daha büyük olacak şekilde ayarlanabilmektedir.



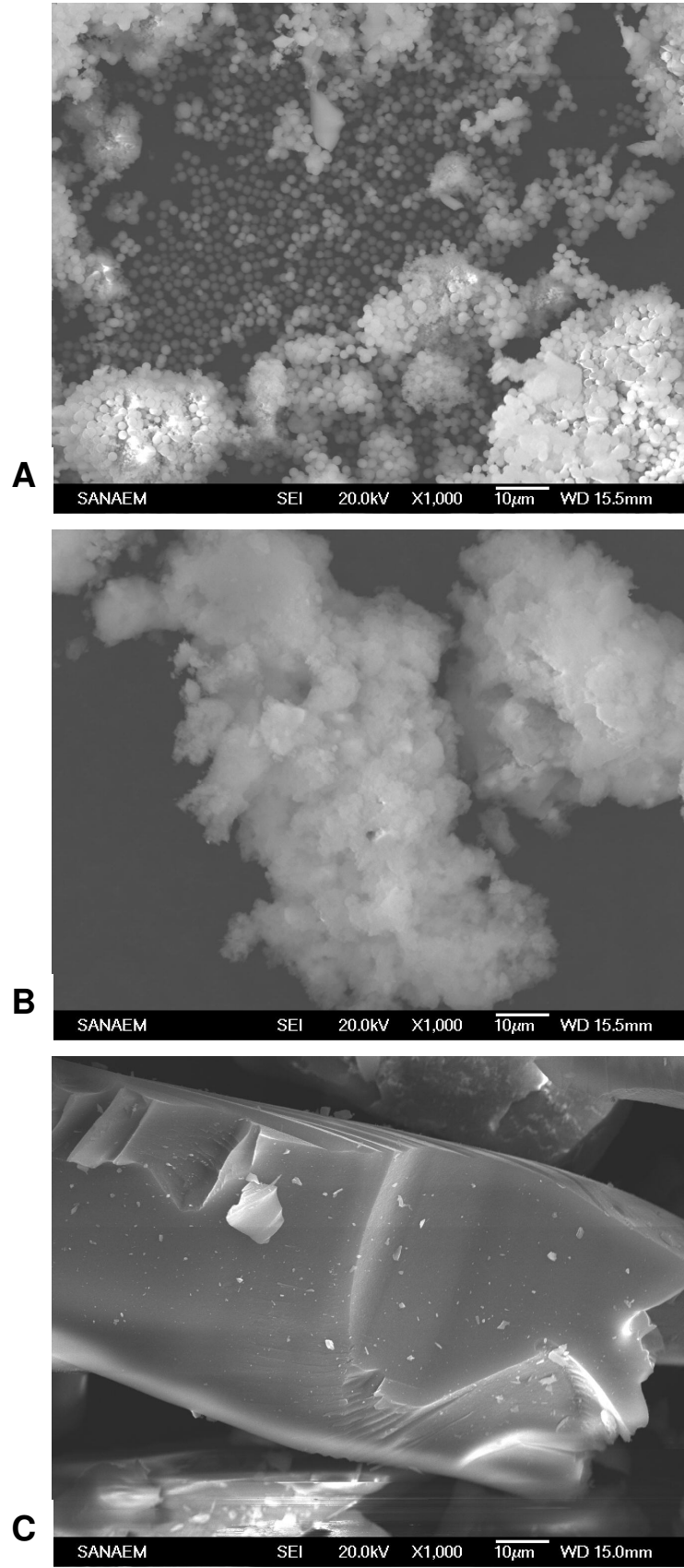
Şekil 4.3. Tripsin tutuklanmamış TEOS sol-jel materyali (BOŞ-TEOS; 1 mL TEOS, 0.6 mL metanol ve 20 mM 0.1mL NaF).

Şekil 4.4'de sırasıyla, enzim tutuklanmamış TEOS (**BOŞTEOS**), enzim tutuklanmış **TEOS1** ve enzim tutuklanmış **TMOS** sol-jellerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Enzim varlığında yapılan sentezler sonucu oluşan TEOS sol-jelinde, enzim etrafını saran kafes yapısında bir materyalin olduğu gözlenmektedir ve ortalama büyüklükleri aynı olan düzgün küre yapısında bozulma ile birlikte kümeleşmenin olduğu görülmektedir. Bu da enzimin sol-jel içerisine hedeflendiği şekilde hapsedildiğini ifade etmektedir.

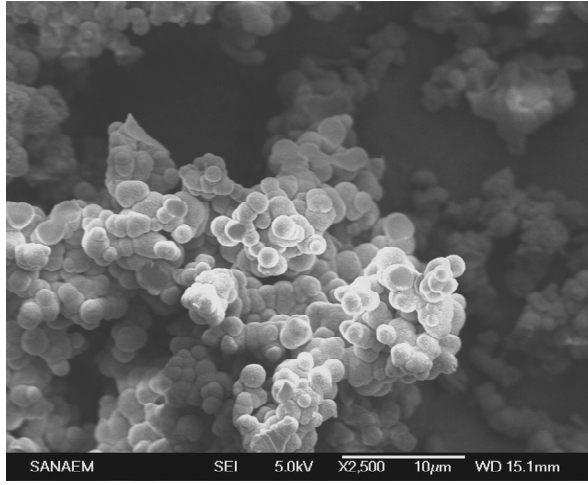
TEOS yerine TMOS başlangıç materyali kullanılarak enzim varlığında benzer deneyler tekrarlandığında elde edilen sol-jellerin yüzeylerinin oldukça düzgün olduğu ve mikrokürelerin oluşmadığı gözlenmiştir. Oluşan TMOS sol-jelinin bu farklı yüzey morfolojisi, tripsin enziminin etkin bir şekilde tutuklanmasına izin vermediğini göstermektedir.

Bu tartışmalar daha sonraki bölümlerde diğer karakterizasyon teknikleri ve proteinlerin, peptid kütle parmakizi analizleri ile daha fazla açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır.

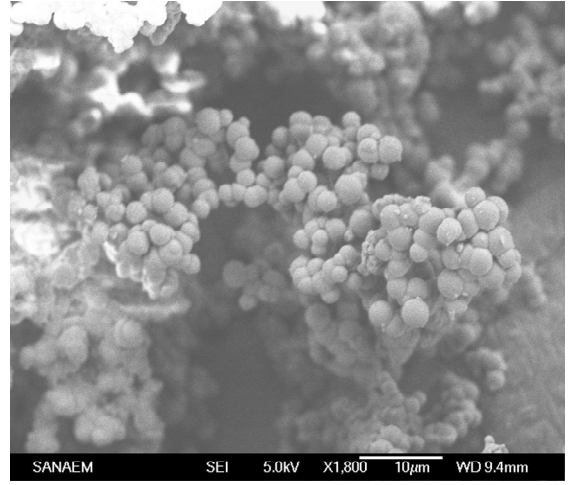
Şekil 4.5. de Polietilen Glikol kullanılarak sentezlenen ve Çizelge 4.3'de belirtilmiş olan sol-jellerin, Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüleri verilmiştir. Bu şekilden görüldüğü üzere ortama değişik molekül ağırlığında PEG ilave edildiğinde daha sarmal ve daha geniş bir sol-jel yapısı olduğu ve bu sol-jeller de iç boşluklar daha geniş ve fazla sayıda oluşmaktadır. Bu görüntü daha önce çok düzgün olarak elde edilen ve PEG in olmadığı ortamdaki TMOS sol-jellerinde bile belirli bir modifikasyon oluşturmuş ve bu boşluklarda enzimler tutuklanabilecek hale gelmiştir. Bunun yanı sıra hem PEG molekül ağırlığı hem de sol-jel ortamına ilave edilen miktarı çok önemli olmaktadır. Örneğin PEG 7 de PEG 1000 0.1 mol ve PEG8 de aynı başlatıcı kullanılarak bu kez hem PEG1000 den PEG6000 e geçilerek molekül ağırlığı artırılmış hem de eklenen PEG miktarı da 0.1 mol den 0.6 mol'e çıkarılmıştır. Bu yapıldığında oluşan sol-jel daha çok sarmal ve daha çok gözenek oluşturmuş ve bu gözeneklerin boyutu da artırılarak daha fazla miktarda enzimin bu gözeneklere dolması mümkün hale getirilmiştir. Bu da hedeflenen sistemin çalışma performansını artıracaktır. Bu performans daha sonra MALDI-Kütle spektrometresi ile oluşan peptidlerin tayini ile çok daha duyarlı belirlenecektir.



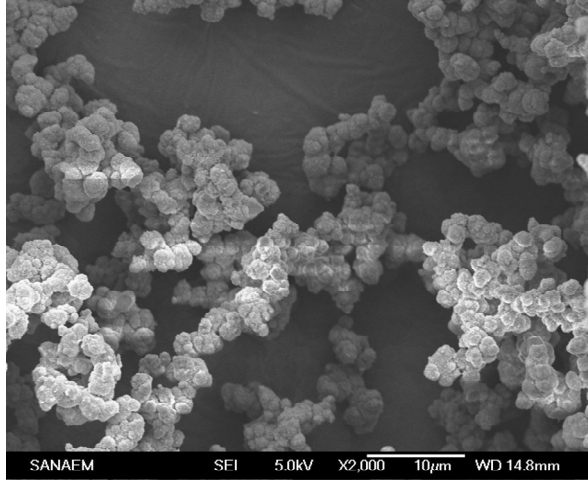
Şekil 4.4. Sol-jellerin SEM fotoğrafları. (A) Tripsin tutuklanmamış TEOS (BOŞTEOS) sol-jeli. (B) Tripsin tutuklanmış TEOS1 sol-jeli. (C) Tripsin tutuklanmış TMOS sol-jeli. Büyütme oranları X1000 olarak verilmiştir.



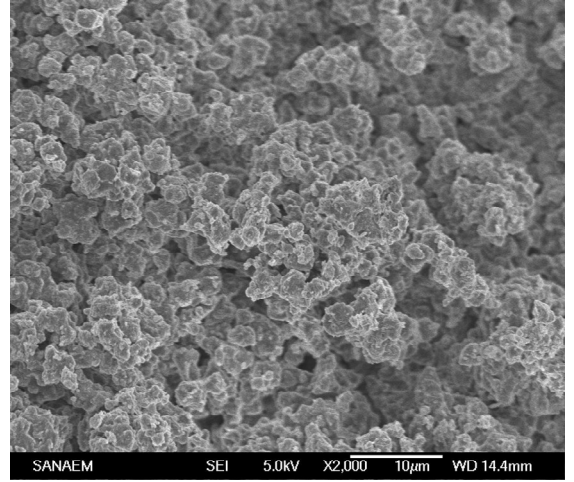
PEG2



PEG4



PEG7

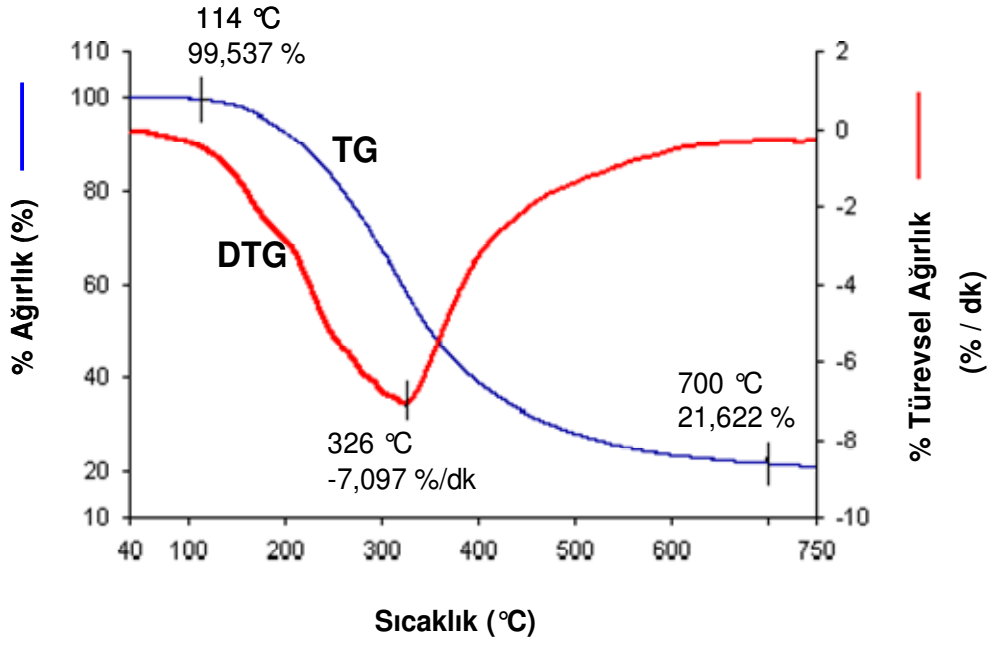


PEG8

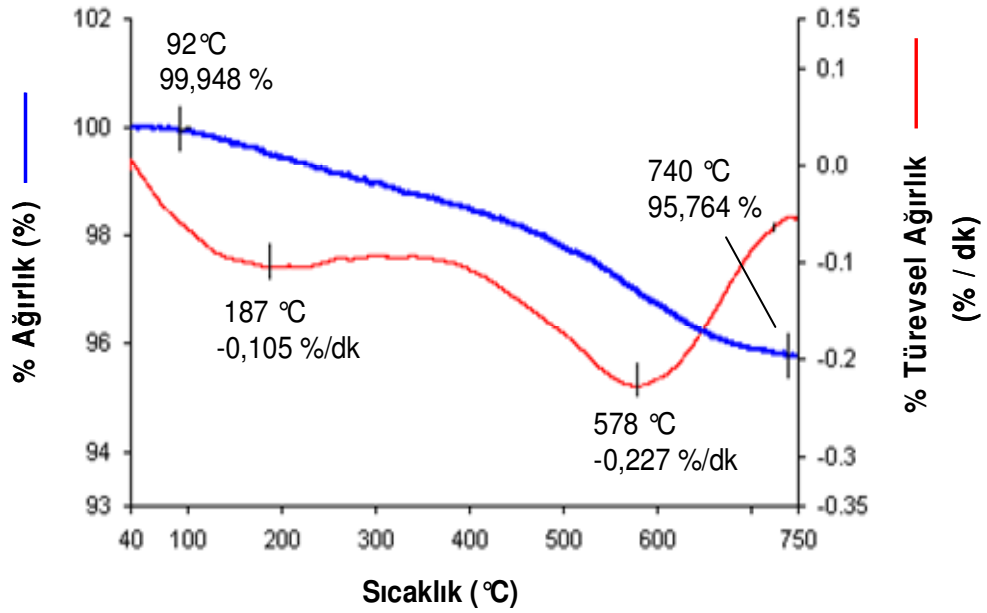
Şekil 4.5. PEG katkı maddesi kullanılarak sentezlenen bazı sol-jellerin SEM fotoğrafları.

4.1.2. TGA analizleri

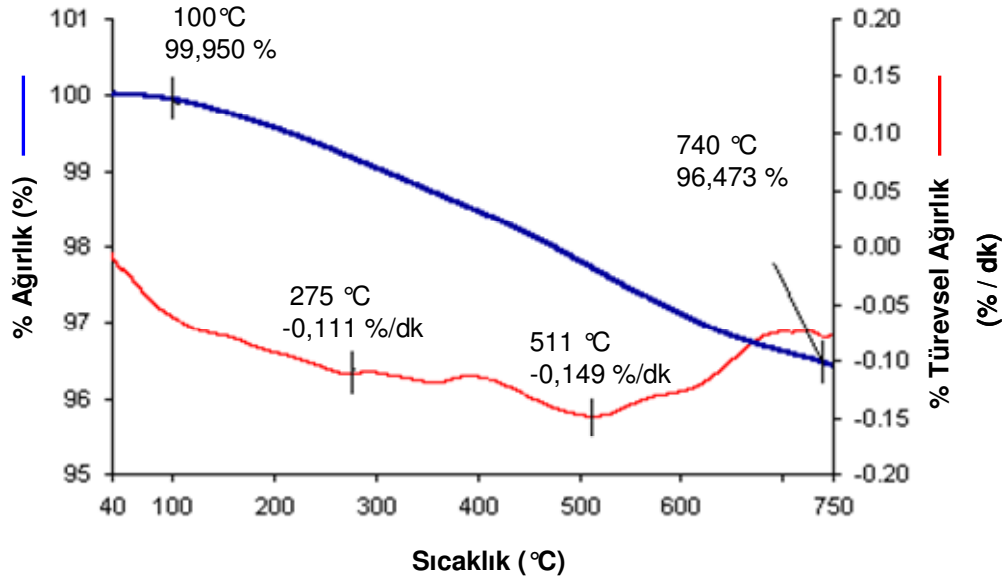
Bu çalışmada üretilen sol-jel yapılarının daha açık bir şekilde karakterize edilebilmesi için ve özellikle de tripsin tutuklanması işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla çeşitli türlerin termogravimetrik analizleri yapılmıştır. Tripsin tutuklanmış sol-jellerin belirlenmesi için öncelikle saf ve serbest tripsin enziminin TG eğrisi elde edilmiş ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekil 4.6'da DTG eğrisine bakılınca tekli parçalanma gösterdiği görülmüştür. Bu bozunmaya ait maksimum bozunma sıcaklığı 326 °C'ta gözlenmiş olup 700 °C'taki ağırlık kaybı da % 78.4 olarak belirlenmiştir. Bu ağırlık kaybı tripsin enziminin büyük bir kısmının bozunma ile uçucu hale geldiğini ve % 20 civarındaki kısmının da karbonlaşmış olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.7'de verilen BOŞTEOS sol-jeline ait DTG eğrisinden enzimin maksimum bozunma gösterdiği 326 °C'ta bir bozunma içermemekte fakat 187 °C'ta ve 578 °C'ta ikili bozunma göstermektedir. Enzim varlığında sentezlenmiş TEOS1 sol-jel'inin TG ve DTG eğrileri de Şekil 4.8'de verilmiştir. Görüldüğü üzere enzim tutuklanmış aynı sol-jel'in DTG eğrisinde maksimum bozunma sıcaklığı 275 °C'ta ve 511 °C'ta olmak üzere ikili bozunma göstermiştir. Bunlardan birincisinin sıcaklığı serbest tripsin enziminin maksimum bozunma sıcaklığına çok yakın ama biraz daha düşüktür. Bu ise enzimin sol-jel içerisinde bazı gruplarla etkileşmesi nedeni ile daha düşük sıcaklıkta bozunabildiğini göstermektedir ve bu tür parçalanma enzimin yan zincirindeki bozunmayı kolaylaştırmaktadır. Ancak bu sıcaklık düşmesi çok fazla ve kritik değildir. Aynı şekilde sol-jel'in kendisine ait maksimum bozunma sıcaklığı saf sol-jel de 578 °C'ta gözlenirken benzer şekilde 511 °C'a kaymıştır ve sol-jel içerisinde kalan enzim sol-jelin bu bozunma sıcaklığını biraz daha düşük sıcaklık değerlerine çekmiştir. Sonuç olarak enzim varlığında sentezlenen bu sol-jeller içerisinde belirli ölçüde tripsin enziminin tutuklandığı termogravimetrik deneylerden belirlenmiştir. Bu enzim tutuklanmış sol-jeller birçok çözücü ortamında defalarca ve uzun sürelerde yıkanıp, fiziksel olarak tutunan enzim uzaklaştırıldıktan sonra bu termogravimetrik analizler gerçekleştirildiğinden, gözlenen enzimin sol-jellerin gözenek yapılarında hapsedildiğini göstermektedir.



Şekil 4.6. Tripsinin TG ve DTG eğrileri.

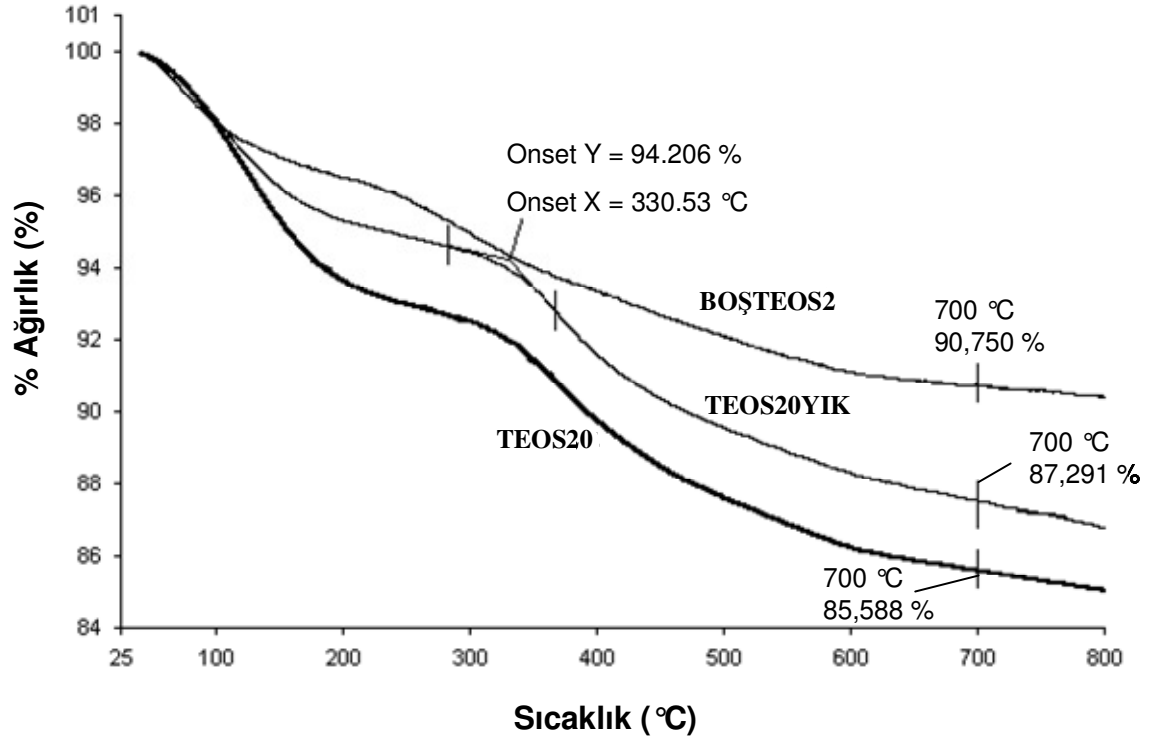


Şekil 4.7. BOŞTEOS sol-jelinin TG ve DTG eğrileri. (Ti=92.00 Tf=740.00)



Şekil 4.8. TEOS 1 sol-jelinin TG ve DTG eğrileri.

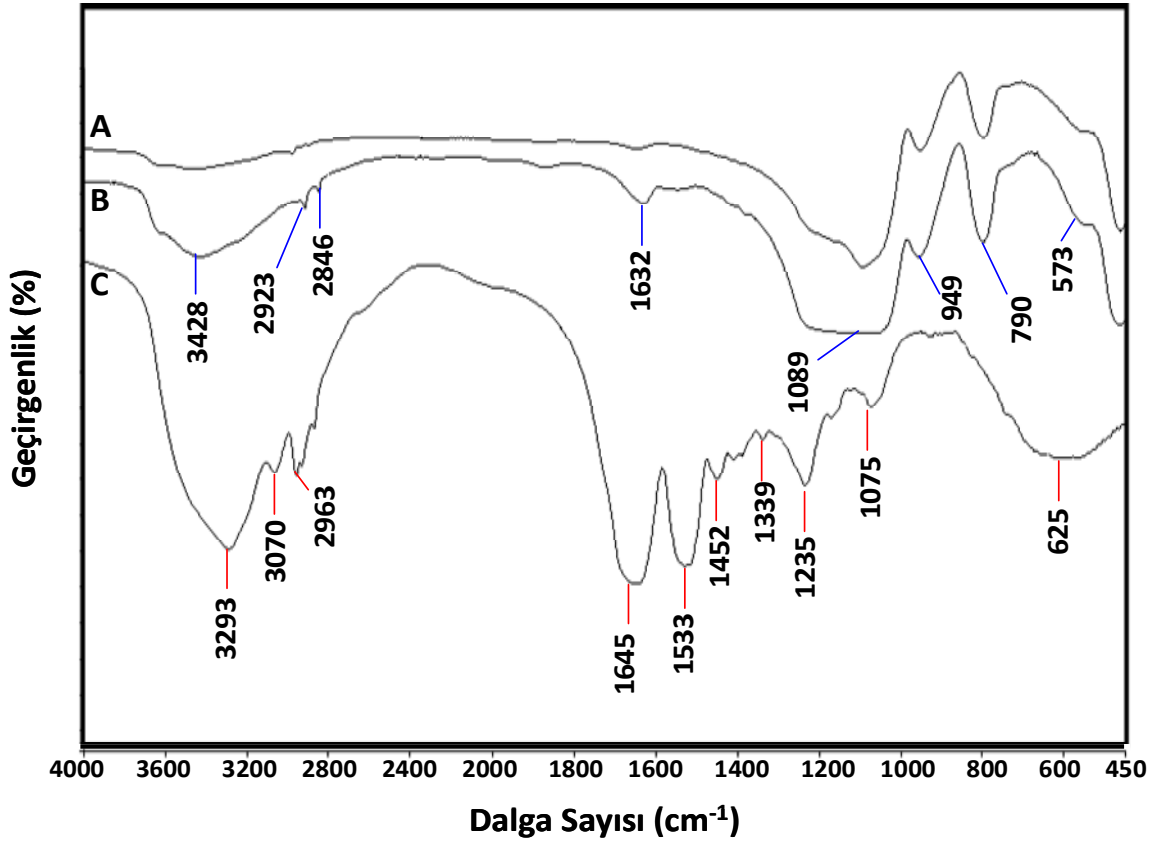
Şekil 4.9'da verilen, sadece TEOS'dan üretilen sol-jel (BOŞTEOS2), 20 mg tripsin enziminin bulunduğu ortamda TEOS'dan sentezlenen sol-jel (TEOS20) ve 20 mg tripsin kullanılarak sentezlenen TEOS20'nin yıkanmış hali (TEOS20YIK) sol-jellerinin TG eğrilerinden, enzimin sol-jel içerisinde oldukça uygun bir şekilde tutuklandığı görülmektedir. Tripsine ait maksimum bozunma, tripsin tutuklanmış sol-jellerde 330 °C civarında gözlemlenmekte, bu bozunma ise enzim bulunmayan ortamda TEOS başlatıcısı ile sentezlenen BOŞTEOS2 sol-jelinde gözlemlenmemektedir. Bu sonuç tripsin enziminin sol-jel içerisine hapsoldüğünü karakterize etmektedir. Bununla birlikte belirli miktar enzim sol-jel üzerine fiziksel adsorblanmaktadır. Ancak sol-jel iyice yıkanarak bu enzimler uzaklaştırılabilir. Bu durum yıkanmış ve yıkanmamış enzim tutuklanmış sol-jellerin (TEOS20 ve TEOS20YIK) TG'lerinden izlenmektedir. Diğer taraftan sol-jel yapısındaki enzimin varlığı ağırlık kaybından belirlenebilmektedir. BOŞTEOS2'de ağırlık kaybı % 9.25 iken yıkanmamış enzim tutuklanmış sol-jelde (TEOS20) % 14.4 ve yıkanmış enzim tutuklanmış sol-jelde (TEOS20YIK) ise %12.7'dir. Bu sonuçlar hedeflenen enzim tutuklanmış sol-jellerin uygun bir şekilde çalışabilmesini sağlayacak kadar enzimin sol-jel içerisine tutuklandığını göstermektedir.



Şekil 4.9. BOŞTEOS2, TEOS20 (20 mg tripsin doplanmış TEOS1) ve TEOS20YIK (yıkılmış) sol-jellerinin TG eğrileri.

4.1.3. FT-IR analizleri

TEOS başlatıcısı kullanılarak sentezlenen, tripsin tutuklanmamış (BOŞTEOS) ve tripsin tutuklanmış (TEOS1) sol-jellerin karakterizasyonu için, FT-IR spektrumları elde edilmiş, tripsinin FT-IR spektrumu ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.10'da verilmiştir. FT-IR spektrumları, sentezlenen sol-jellerin yapısının aydınlatılması ve tripsin tutuklanması ile birlikte yapıda meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi için elde edilmiştir.



Şekil 4.10. FTIR Spektrumları. (A) Enzim tutuklanmamış TEOS başlatıcı ile sentezlenen sol-jel (BOŞTEOS) (B) Enzim tutuklanmış TEOS başlatıcı ile sentezlenen sol-jel (TEOS1) (C) Tripsin.

Şekil 4.10.A ve B'deki BOŞTEOS ve TEOS1'in FTIR spektrumlarına bakıldığında, 1000-1200 cm^{-1} deki absorpsiyon bandları, sol-jel yapısındaki Si-O-Si gerilme titreşimlerine, 949, 790, 573, 464 cm^{-1} deki absorpsiyon bantları ise yine yapıdaki Si-O-Si bükülme titreşim absorpsiyonlarına karşılık gelmektedir.

Tripsin molekülünün yapısındaki aminoasitlerin varlığından kaynaklanan NRH_2 (primer amin), -OH ve C=O pikleri sırası ile 3500-3300 cm^{-1} , 3650-3500 cm^{-1} , 1850-1600 cm^{-1} civarında görülmelidir (Erdik, 1998). Şekil 4.10.C'deki FTIR spektrumuna bakıldığında, (-OH) titreşimi, 3600-3200 cm^{-1} frekansı civarında yayvan absorpsiyon bandı olarak görülmektedir ve -OH ve -NH absorpsiyon bölgelerinin üst üste çakıştığı gözlenmektedir. FT-IR spektrumunun ortasında 1645 cm^{-1} civarında gözlenen güçlü absorpsiyon piki, karbonil grubuna (C=O) karşılık gelir. Yine bu bölgede gözlenen orta şiddette veya daha zayıf olan absorpsiyon pikleri aminoasitlerin yapısındaki C=C gruplarına aittir.

Tripsinin, TEOS sol-jeli içerisine tutuklandığını gösteren önemli bulgular, Şekil 4.10.B spektrumundaki farklılıklardır. Bu spektruma bakıldığında, 3428, 2923, 2846, 1632 cm^{-1} bantlarının yüzeyde kalmış olan silanol grupları (Si-OH) ve tripsin molekülündeki -OH ve -NH grupları arasındaki hidrojen bağı titreşimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu piklere bakıldığında tripsinin sol-jel yapısı içerisine tutuklanması ile hidrojen bağı etkileşimlerinin arttığı ve BOŞTEOS'da olmayan titreşim absorpsiyon bantlarının oluştuğu görülmektedir. Ayrıca 1089 cm^{-1} civarındaki (1000-1200 cm^{-1}) Si-O-Si gerilme titreşim absorpsiyon bantında, muhtemel Si-O-Si köprülerinin kırılmasından kaynaklanan bir değişiklik de meydana gelmektedir.

FT-IR spektrumlarında 1645 ve 1533 cm^{-1} de gözlenen karbonil ve C=C çift bağına ait gerilme absorpsiyon piklerinin tripsin varlığında gözlenmesi ile birlikte, 3200-3600 cm^{-1} aralığında şiddetlerin artması ve 1235 ve 1075 cm^{-1} deki absorpsiyon piklerinin şiddetlerinin artması sol-jel yapısına tripsinin girdiğini göstermektedir. Burada en önemli iki bulgu ise, şiddetleri artan piklerin bu şiddetlerinin çok yüksek artmaması ilave edilen enzimin azlığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca enzim tutuklanmış sol-jellerdeki absorpsiyon piklerinin yayvan olarak gözlenmesidir. Enzimin fazla tutuklanması hem gereksiz hemde pahalı bir işlemdir. Çünkü çok az enzim fazla sayıda proteini defalarca parçalayabilmektedir. Sol-jel yapısında absorpsiyon bandlarının geniş olması polimerik özellikten gelmektedir. Keskin absorpsiyon bandlarının genişlemesi polimere özgün bir durumdur. Tüm bu bilgilere göre enzimin başarılı bir şekilde sol-jel içerisinde uygun bir şekilde tutuklanabildiği tespit edilmiştir.

4.2. MALDI-Kütle Spektrometresi ile Analizler

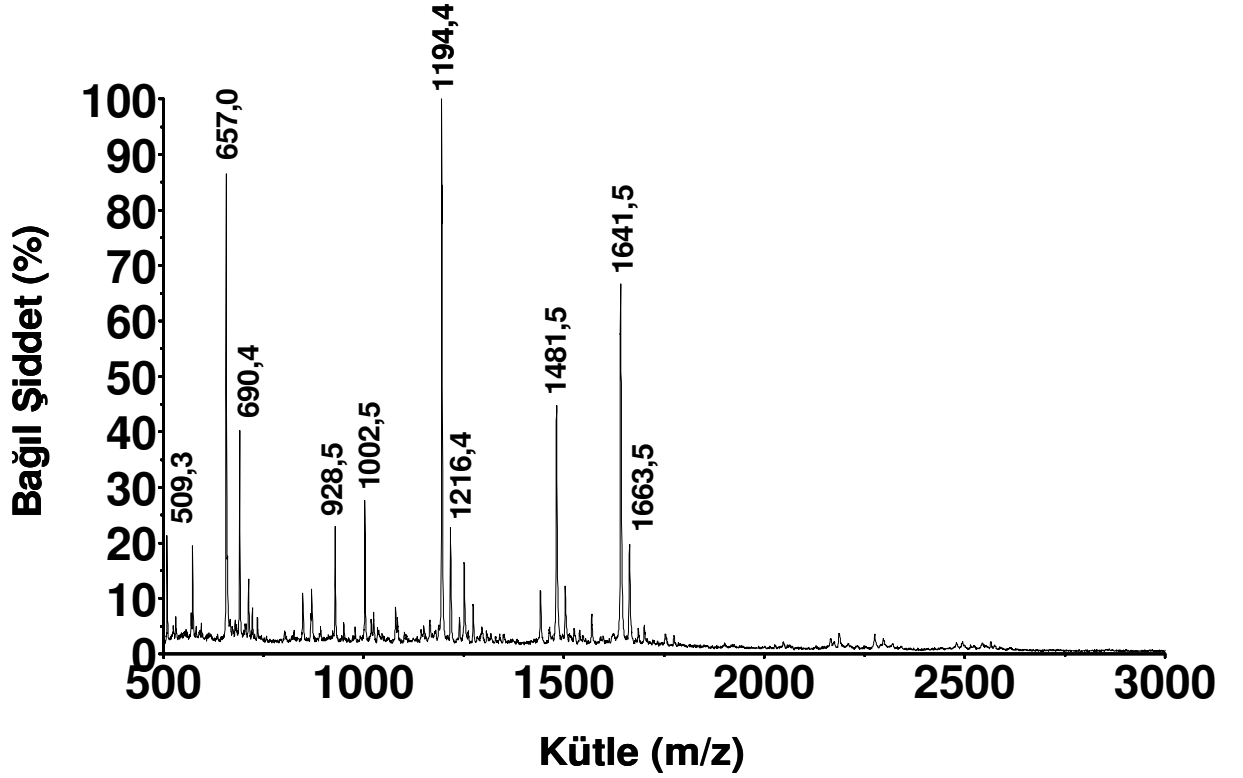
Proteomiks çalışmalarının en etkin yöntemlerinden biri olan, proteinlerin tripsin ile enzimatik parçalanmaları ve oluşan peptid kütlelerinin MALDI-Kütle Spektrometresi tekniği ile belirlenmesi, çalışmanın temel hedefini oluşturmuştur. Bu anlamda, tutuklanmış tripsin enzimi kullanılarak protein parçalama işlemi gerçekleştirilmiş ve çözeltide serbest enzimlerle gerçekleştirilebilecek protein parçalama işlemlerindeki birçok güçlük ve dezavantaj giderilmeye çalışılmıştır. Bu dezavantajlar; (1) Çözeltide veya poliakrilamid jel elektroforez sonrası saflaştırılan

proteinlerin jel içerisinde, serbest tripsin enzimi ile parçalanması işlemleri çok zor ve uzun süreli (ortalama 16-24 saat) protokollerdir. Ayrıca tekrarlanabilirlikleri oldukça güç işlemlerdir. Bu zorlukların giderilebilmesi ve proteinler için teorik olarak türetilmiş peptid kütle parmakizi analizlerine en yakın sonuçların elde edilebilmesi için tripsin enzimini, uygun bir matriks içerisinde tutuklama işlemi en uygun yol olarak seçilmiştir. (2) Proteinleri parçalama amacıyla kullanılan tripsin enzimi, oldukça pahalı bir enzimdir. Bu nedenle çözelti ortamında gerçekleştirilen protein parçalama işlemi sonrası, kullanılan tripsin enziminin geri kazanımı imkansızdır. Ancak uygun bir matrikse tutuklanan tripsin enzimi, uzun bir süre aktivitesini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılabilir. Bu durum da çalışmaların maliyeti açısından çok önemli bir avantaj sağlamaktadır. (3) Bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde, ortaya çıkan bir diğer önemli özellik ise, yine çözelti ortamında serbest tripsin enzimi kullanılarak yapılan protein parçalama işlemleri sonucunda, tripsinin otolizine ait peptid parçalanma ürünleri oluşmaktadır. Bu otoliz ürünleri, MALDI-Kütle Spektrometresi spektrumlarında peptid kütle parmakizi belirlenmeye çalışılan protein için, doğru peptid parçalanma ürünlerinin belirlenmesini güçleştirmektedir. İfade edilen tüm bu olumsuzlukların giderilmesi için yapılan çalışmalar, aşağıda gösterilecek olan MALDI-Kütle Spektrometresi analizleri ile ayrı ayrı incelenmektedir.

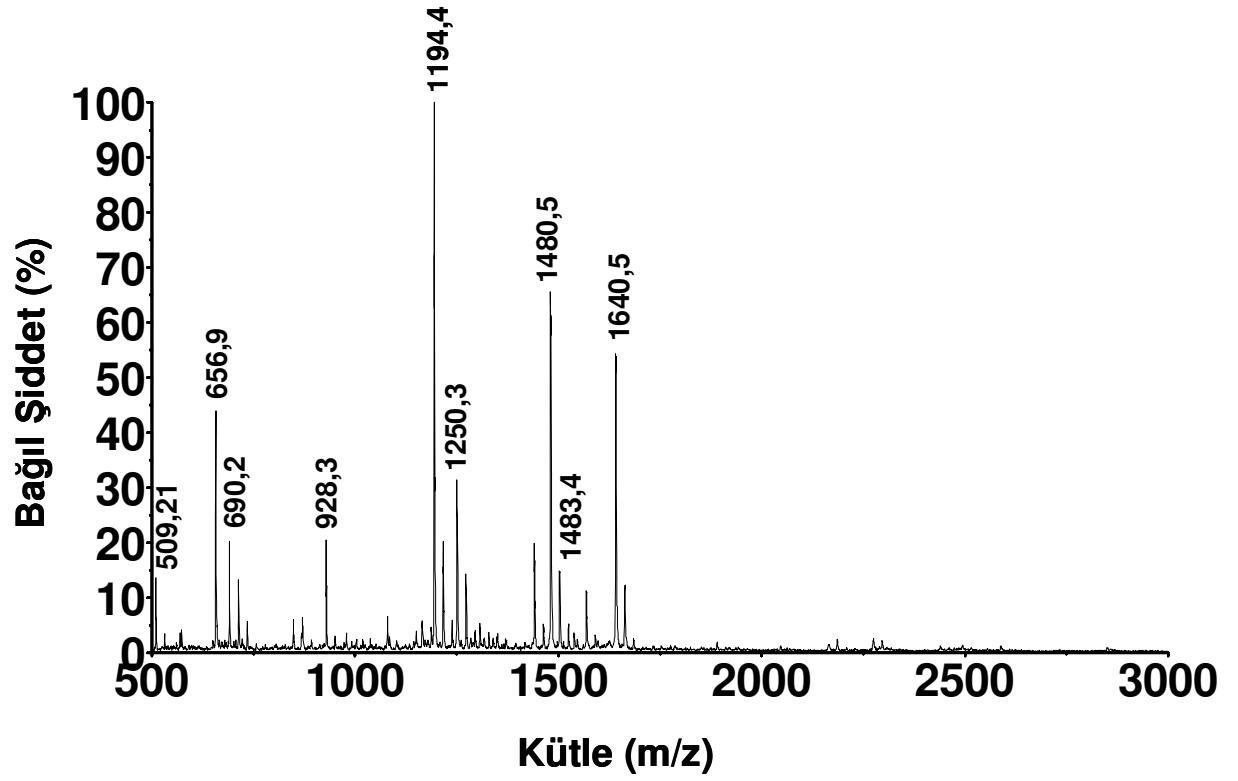
Tripsin enziminin tutuklanması için uygun bir matriksin seçimi deneysel çalışmaların başarısı açısından önemli bir nokta olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu aşamada, üstün materyal özellikleri ve sentez işlemleri esnasındaki kolaylıklar göz önünde bulundurularak, sol-jel yapılarının kullanılması öngörülmüş ve deneysel sonuçlar incelendiğinde sağladığı avantajlar kanıtlanmıştır. Sol-jel işlemiyle tripsin tutuklanmış materyaller hazırlanırken birçok parametre göz önünde bulundurulmuş ve bu sayede oluşan materyalin yapısal özellikleri ile tripsinin tutuklanabilirliği belirlenmiştir. Birçok değişkenin kontrol edildiği sentezlerde, en uygun başlatıcı türü, alkol miktarı, katalizör türü, PEG miktarı belirlenmiştir. Yöntemin sağladığı üstünlükler sayesinde sentezler, tripsin molekülünün yapısal kararlılığını bozmadan ve biyolojik fonksiyonunu kaybetmeden, oda sıcaklığında ve uygun pH aralığında gerçekleştirilmiştir. Uygun sol-jel yapısına tutuklanan tripsinin aktivitesini yaklaşık 6 ay kadar koruduğu belirlenmiştir.

Deneylerde kullanılan tüm proteinlerin aminoasit dizilimleri EK1’de; proteinler için teorik olarak türetilen ve Expasy (<http://www.expasy.org/>) internet adresinden elde edilmiş olan peptid parçalanma ürünlerinin listesi EK2’de verilmiştir.

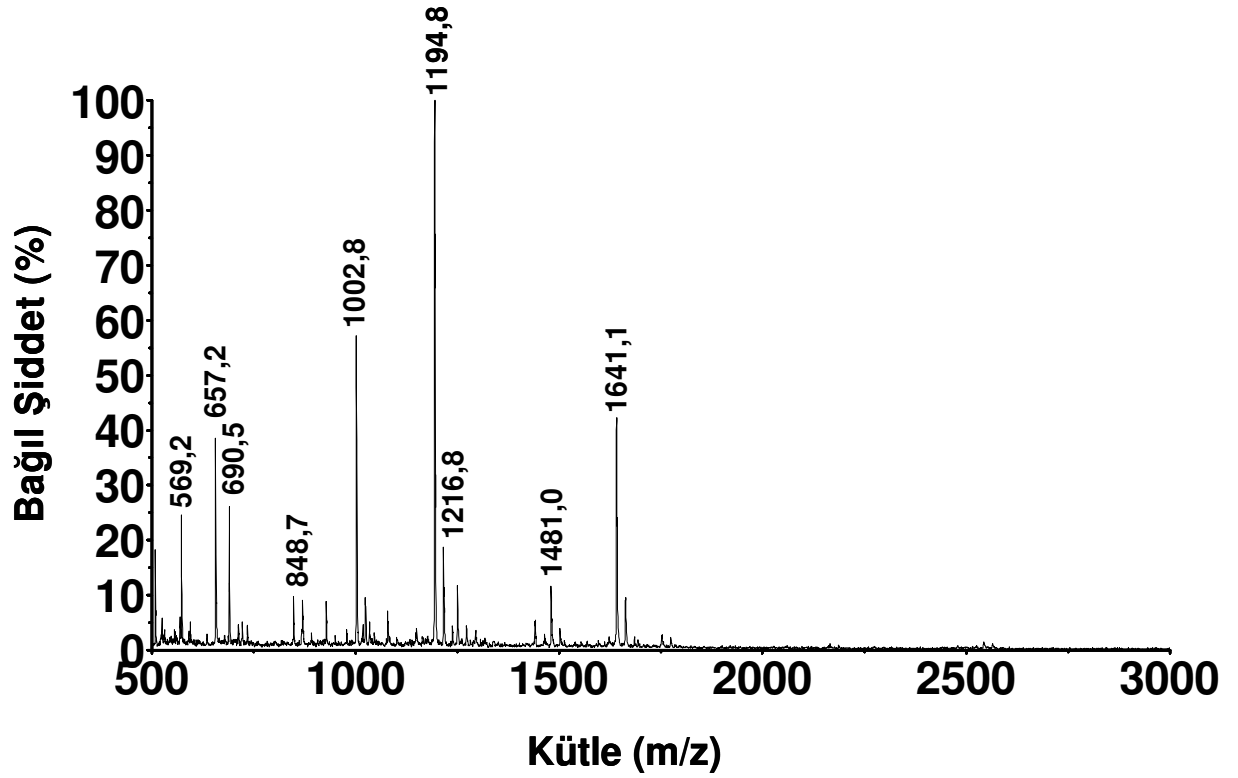
Proteinlerin, MALDI-Kütle Spektrometresi tekniği kullanılarak gerçekleştirilen, peptid kütle parmakizi analizleri için yapılan ilk çalışmalarda; TEOS1,2,3’de farklı alkol miktarları kullanılarak ve TEOS4’de de farklı katalizör kullanılarak sentezlenen jellerin BSA model proteininin parçalanmasında kullanımı ve ortaya çıkan farklılıklar incelenmiştir. Aşağıdaki şekillerde sırasıyla, TEOS1, TEOS2, TEOS3 ve TEOS4 tripsin tutuklanmış sol-jellerinin kullanıldığı, birinci BSA parçalama (1. digestion) çözeltilerinin MALDI-Kütle spektrumları verilmiştir.



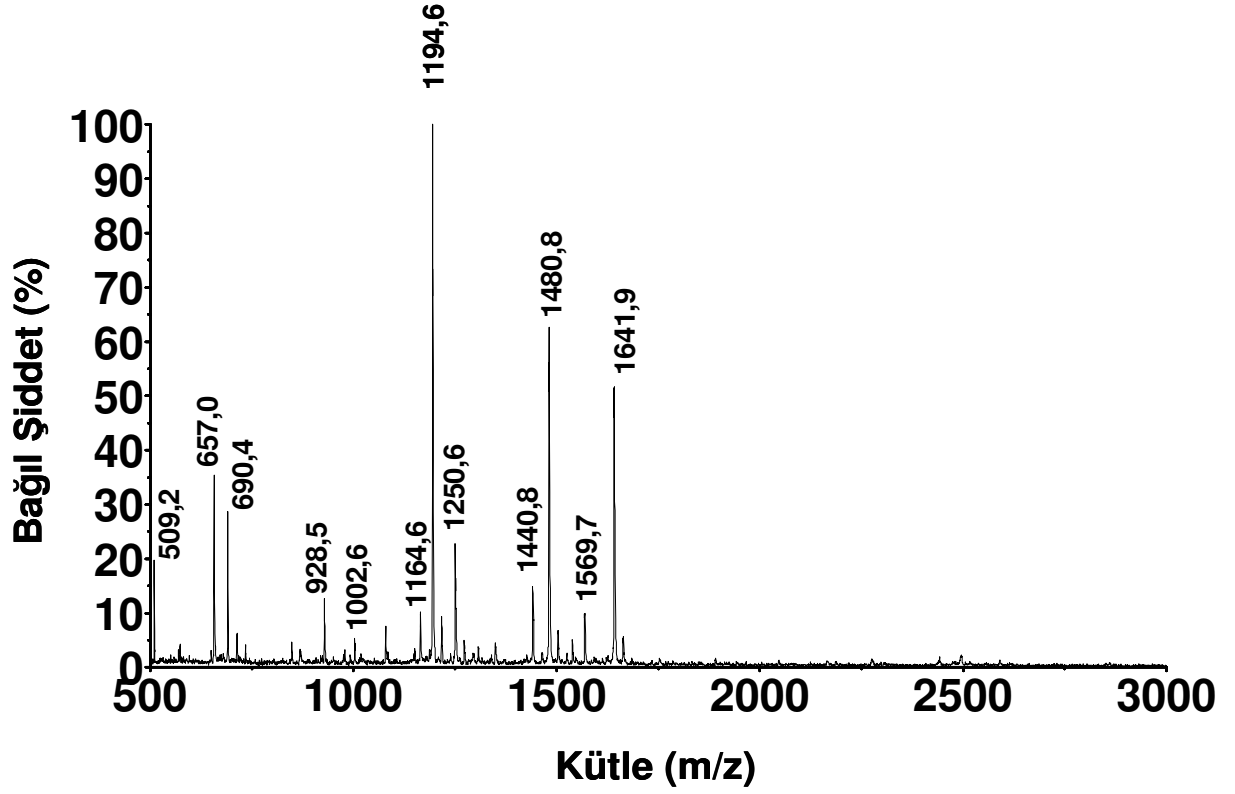
Şekil 4.11. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisi.



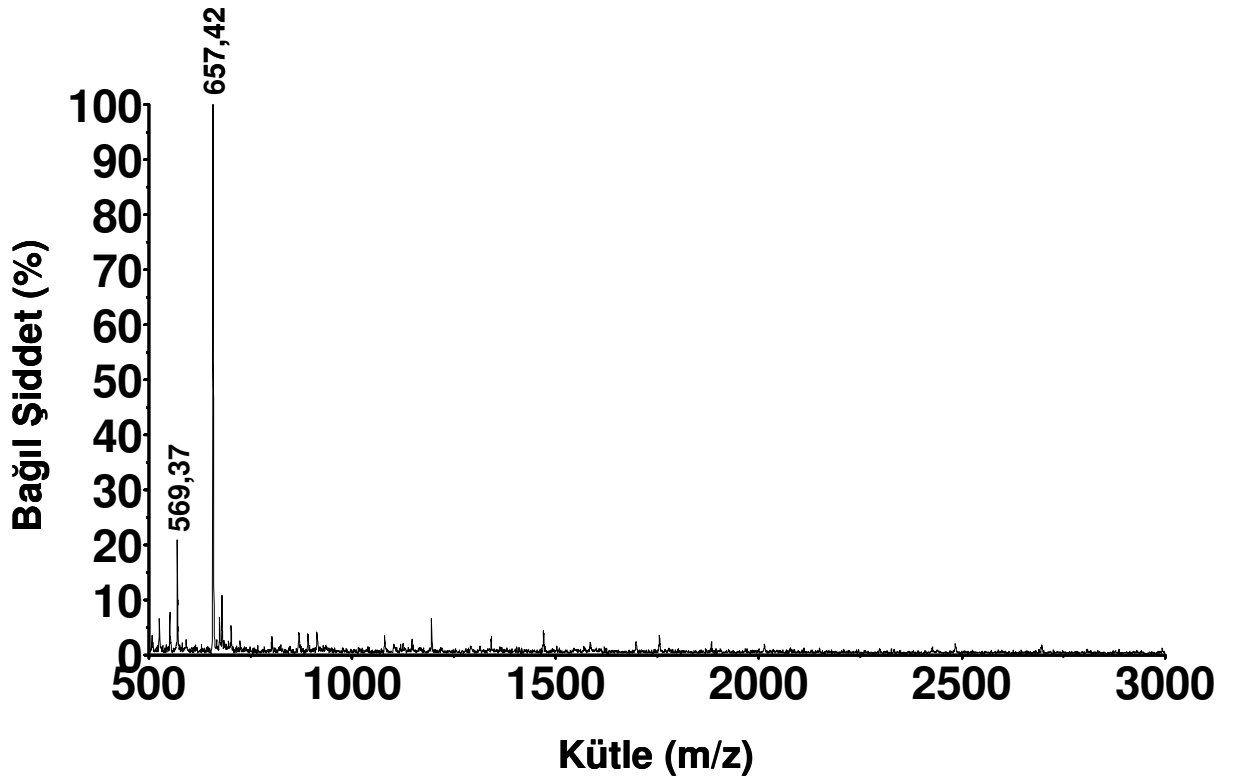
Şekil 4.12. TEOS2 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisi.



Şekil 4.13. TEOS3 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisi.



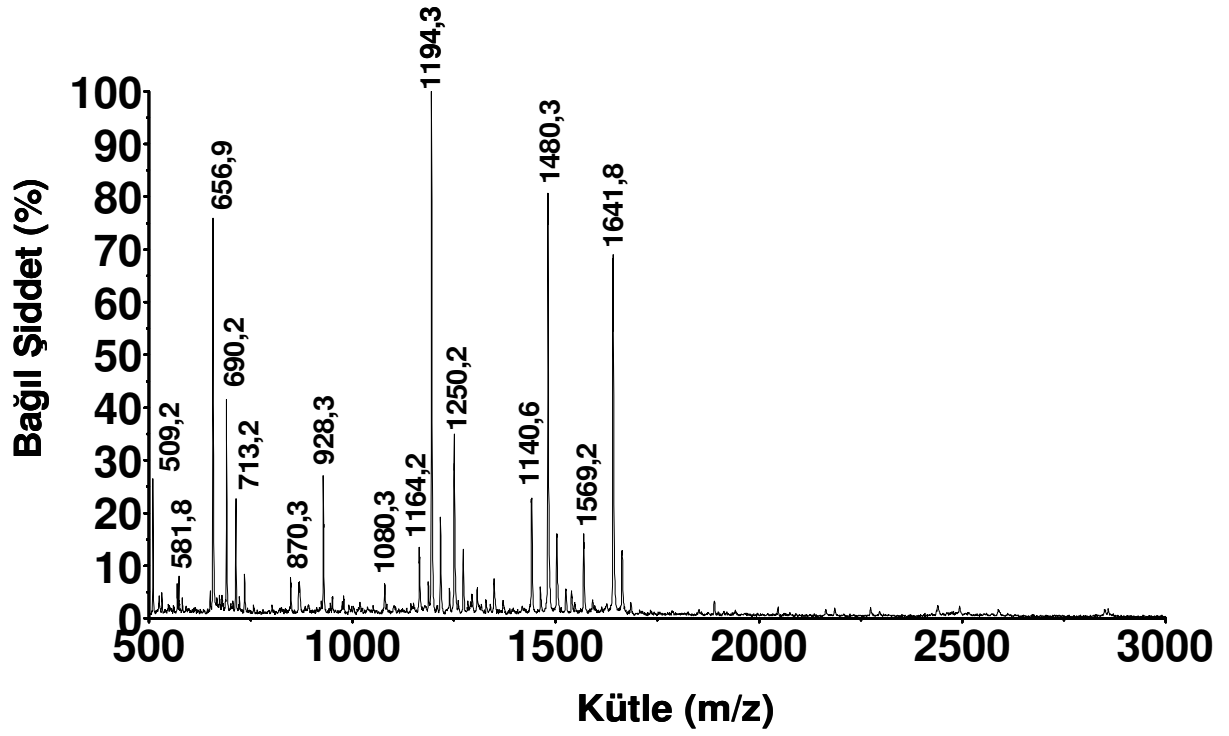
Şekil 4.14. TEOS4 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisi.



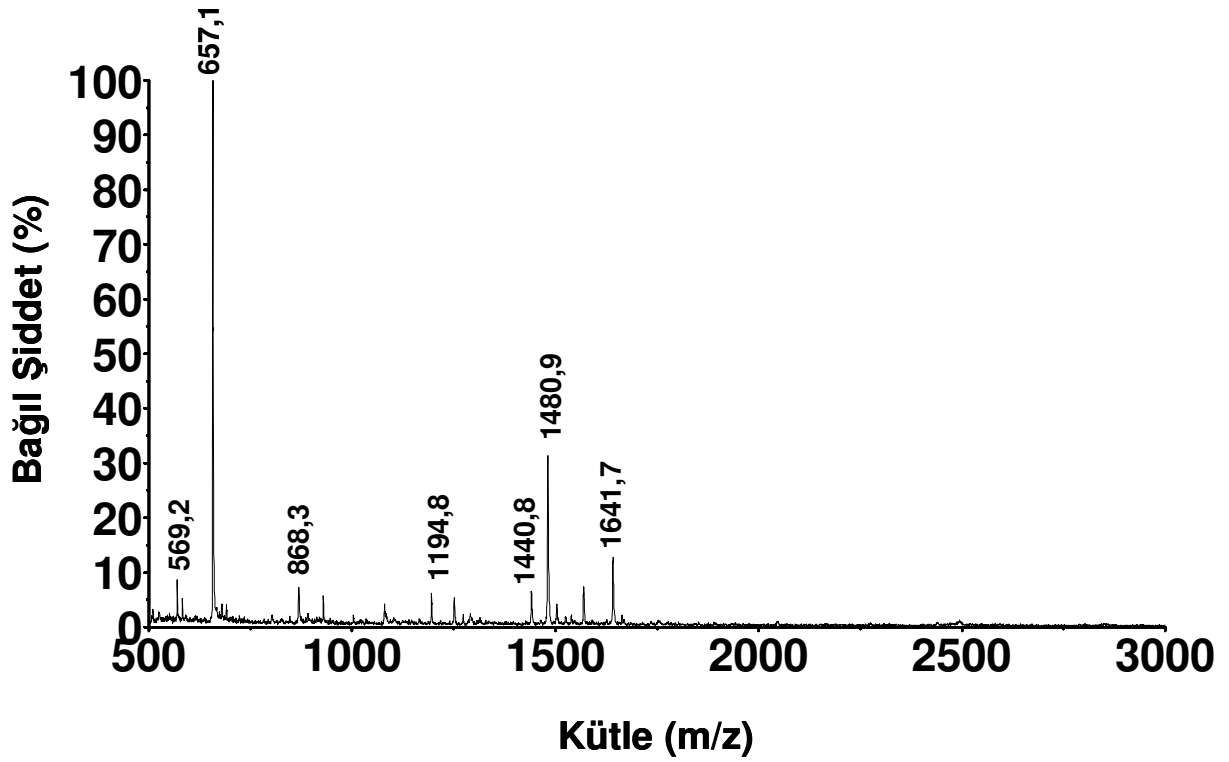
Şekil 4.15. BOŞTEOS (Tripsin tutuklanmamış) sol-jeli ile yapılan kontrol amaçlı BSA parçalama çözeltisi.

Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de verilen MALDI-Kütle spektrumlarında görülen, 928, 1002, 1164, 1194, 1250, 1440, 1480, 1569, 1640 Da kütleli pikler BSA proteininin tripsin ile parçalanmasından oluşan karakteristik peptid pikleridir. Kontrol amacıyla gerçekleştirilen deneyde (Şekil 4.15), BOŞTEOS jeliyle uygun tampon ortamında BSA çözeltisi, diğerleriyle aynı koşullarda 37.7 °C’de muamele edilmiş ve sonuçta incelenen MALDI-Kütle spektrumunda BSA’ya ait peptid parçalanma ürünlerine rastlanmamıştır. Yukarıda gösterilen spektrumlara bakıldığında, farklı alkol miktarı ve katalizör türü kullanılarak sentezlenen jellerin 1. BSA parçalama çözeltilerinin çok farklı olmadığını ve BSA’ya ait peptid parçalanma ürünlerinin oluştuğunu gözlemledik. Ancak 1. protein parçalama işlemi sonrasında yıkanan ve partiküller arasında kalan peptidlerin uzaklaştırıldığı jellerin tekrar kullanılması sonucunda farklılıklar meydana geldiği ve bazı jellerin BSA parçalamasını gerçekleştiremediği gözlemlenmiştir.

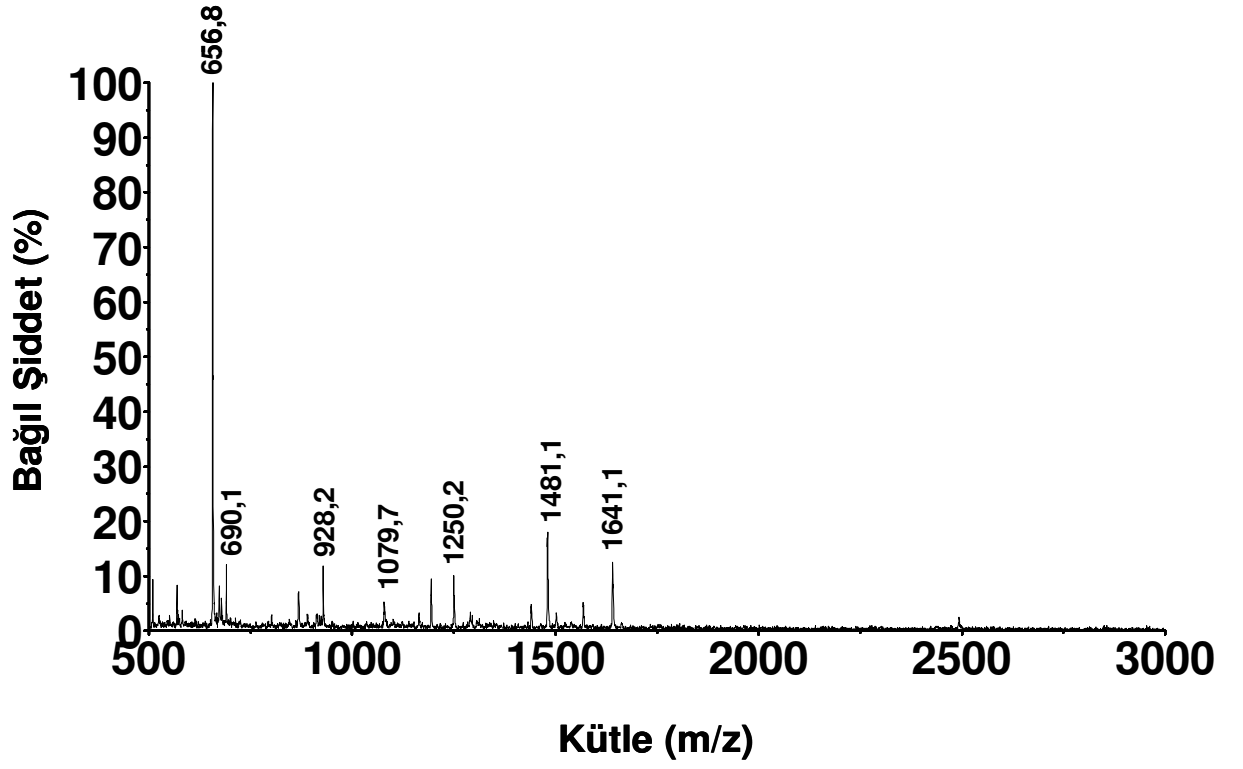
BSA parçalanması, yani sentezlenen tripsin tutuklanmış sol-jellerin, uygun tampon ortamında hazırlanan BSA çözeltisi ile 37.7°C’de inkübe edilmesi işlemi sonrasında oluşan peptid çözeltisi, sol-jel yapısından santrifüjlendirilerek ayrılmıştır. Bu çözelti MALDI-Kütle Spektrometresi sisteminde ana parçalama (1. parçalama) çözeltisi olarak değerlendirilmiştir. Bu işlem sonrasında, oluşan peptid çözeltisinden ayrılan sol-jeller, birkaç defa su ile yıkanarak partiküller arasında kalan peptidlerin uzaklaştırılması sağlanmış ve bir sonraki protein parçalama işlemi için bir anlamda temizlenmiş (BSA peptidleri giderilmiş) hale getirilmiştir. Bu yıkama sularının analizi sol-jel partikülleri arasında kalan peptidlerin tamamen giderilmesinden emin olmak için her protein parçalama işlemi sonrası tekrarlanmıştır. Aşağıda gösterilen şekillerde, (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20) TEOS1 sol-jelinin sırasıyla, 1. BSA parçalama çözeltisi, sonrasında gerçekleştirilen 1. yıkama, 2. yıkama, 3. yıkama ve 4. yıkama çözeltilerinin MALDI-Kütle spektrumlarıdır. Bu spektrumlara bakıldığında, ana peptid çözeltisinde görülen BSA’ya ait peptid parçalanma ürünlerinin yıkamalar neticesinde giderek azaldığı ve sonuncu yıkamada (4. yıkama) peptid parçalanma ürünlerinin sol-jel partiküllerinden tamamen uzaklaştırıldığı görülmektedir. Bu aşamadan sonra aynı jelin, 2. kez protein parçalama işlemi için kullanımına geçilmiştir.



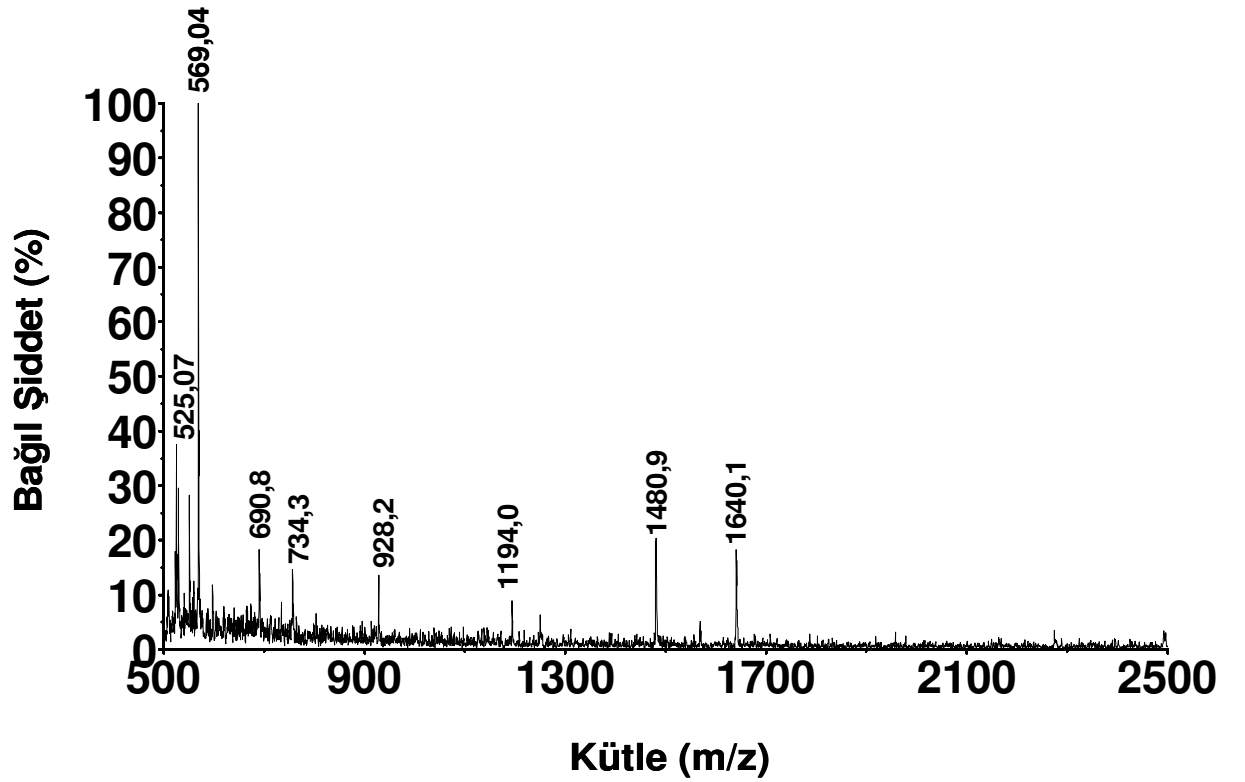
Şekil 4.16. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.



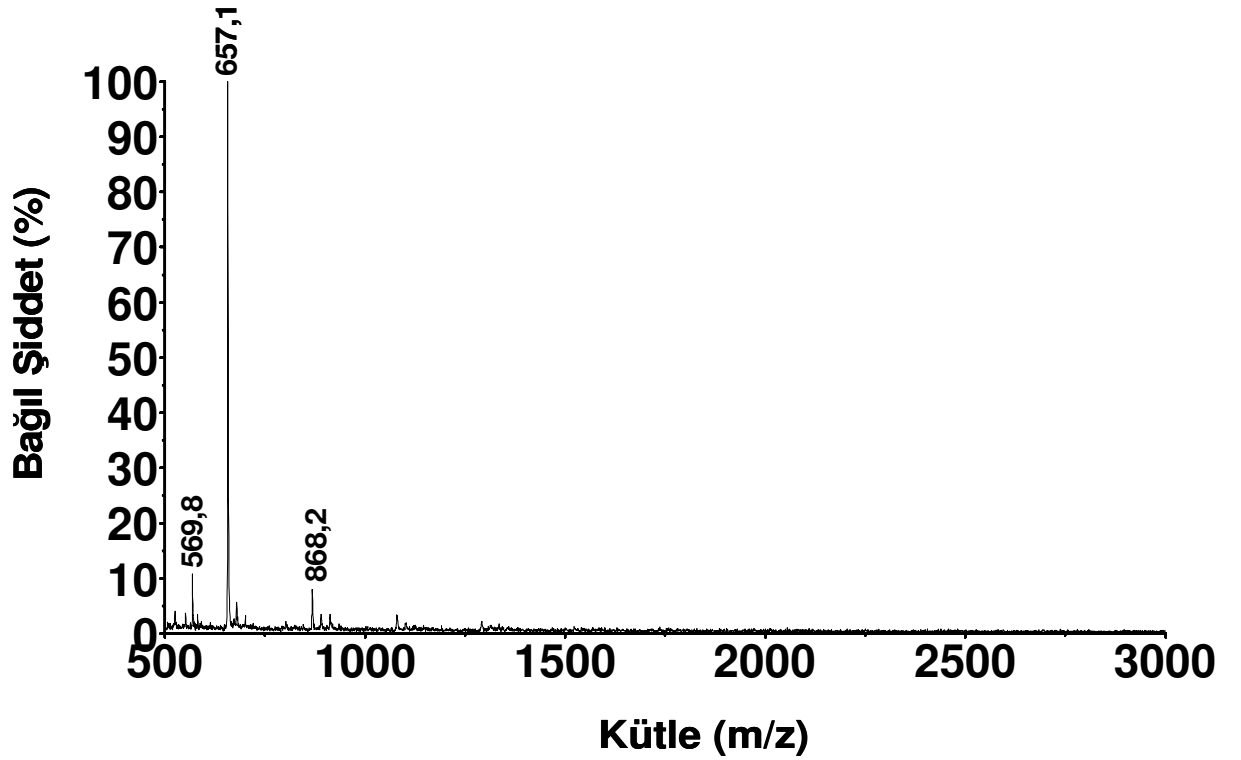
Şekil 4.17. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama işlemi sonrasında gerçekleştirilen 1. yıkama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.



Şekil 4.18. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama işlemi sonrasında gerçekleştirilen 2. yıkama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.



Şekil 4.19. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama işlemi sonrasında gerçekleştirilen 3. yıkama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.

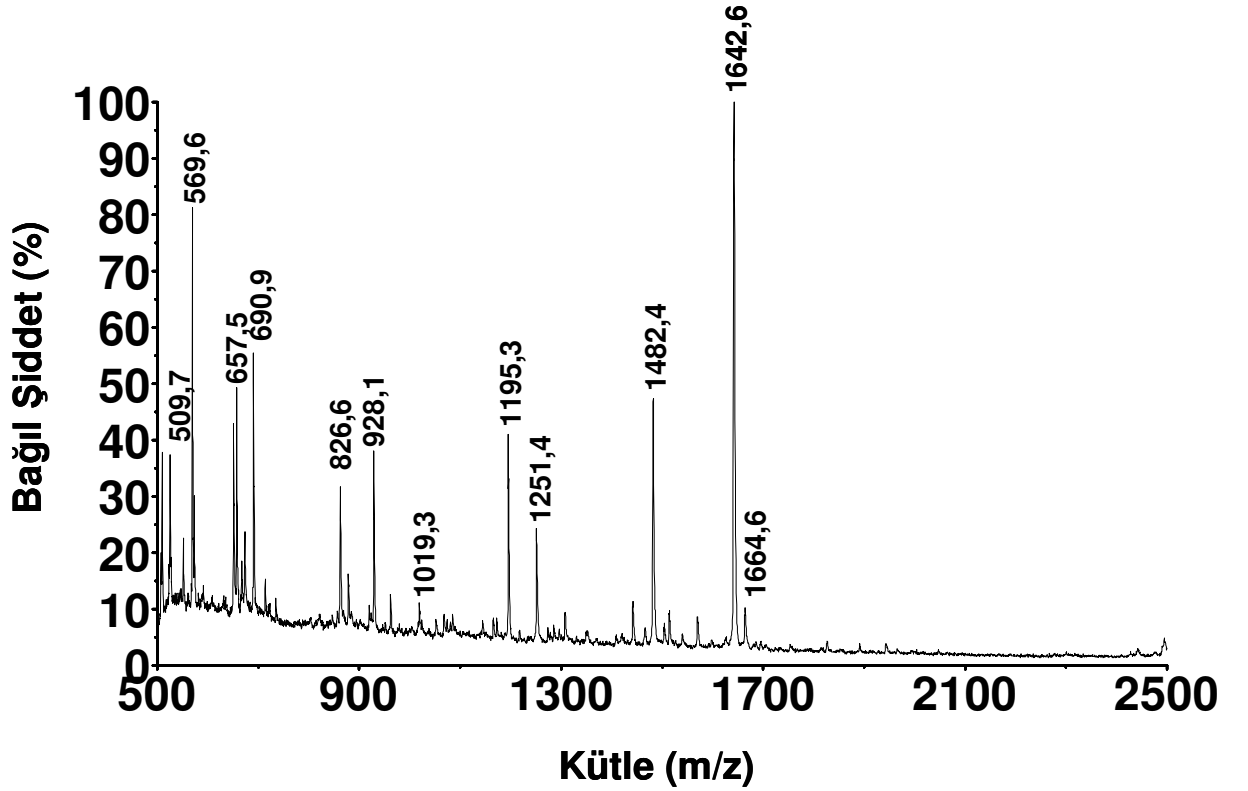


Şekil 4.20. TEOS1 sol-jelinin 1. BSA parçalama işlemi sonrasında gerçekleştirilen 4. yıkama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.

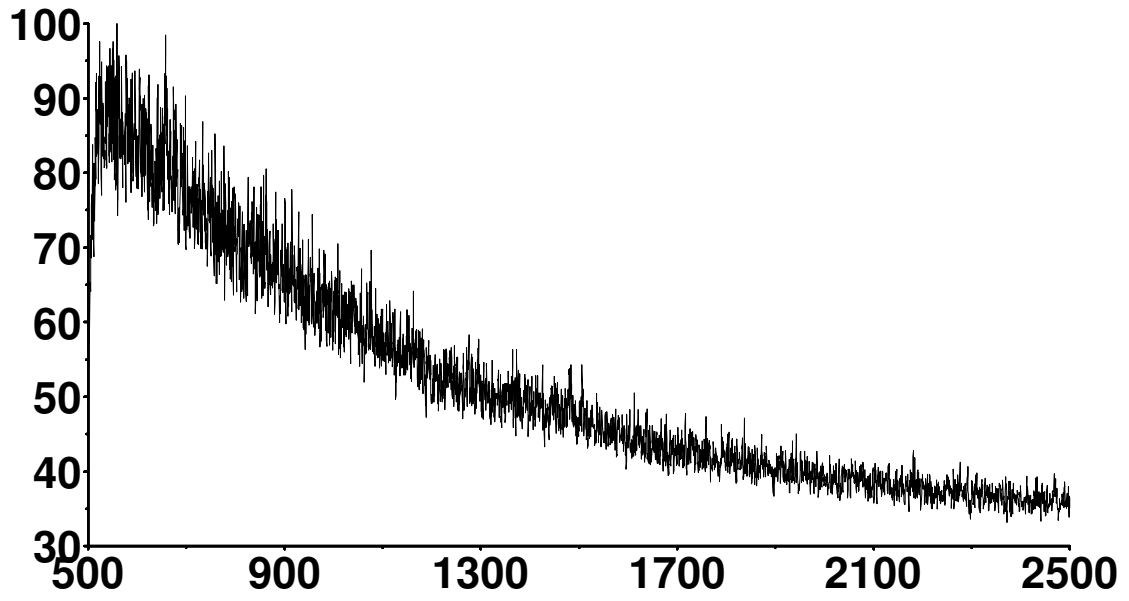
En son yıkama işlemi sonucu elde edilen yıkama çözeltisinde (4. yıkama sonucunda) alınan MALDI-Kütle spektrumunda gözlenen 569.8, 657.1 ve 868.2 Da kütlelerdeki iyon pikleri çok küçük partikül olarak örnek hazırlama işlemi sırasında analiz çözeltisine geçen düşük molekül ağırlıklı sol-jel parçalanma ürünlerinden kaynaklanmakta ve bu kütlelerde BSA'ya ait herhangi bir peptid ürünü bulunmamaktadır.

Bir sonraki aşamada, yıkamalar sonucu kalan peptid çözeltileri tamamen giderilen aynı jeller, 2. kez BSA parçalanması işlemi için yeniden kullanıldı. Sonuçlara baktığımızda, 1. protein parçalama işleminde olduğu gibi 4 sol-jelinde aynı sonuçları vermediği gözlemlenmektedir. TEOS2 ve TEOS4 jellerinin 2. BSA parçalama işleminde hiç çalışmadığını, Şekil 4.22 ve Şekil 4.24'de gösterilen spektrumlarda BSA'ya ait peptidlerin olmamasından anlaşılmaktadır. Tekrar çalışmalarında da oluşan aynı sonuçlar neticesinde, TEOS2 ve TEOS4 sol-jellerinin ancak tek sefer BSA parçalama işleminde kullanılabildiği sonucunu

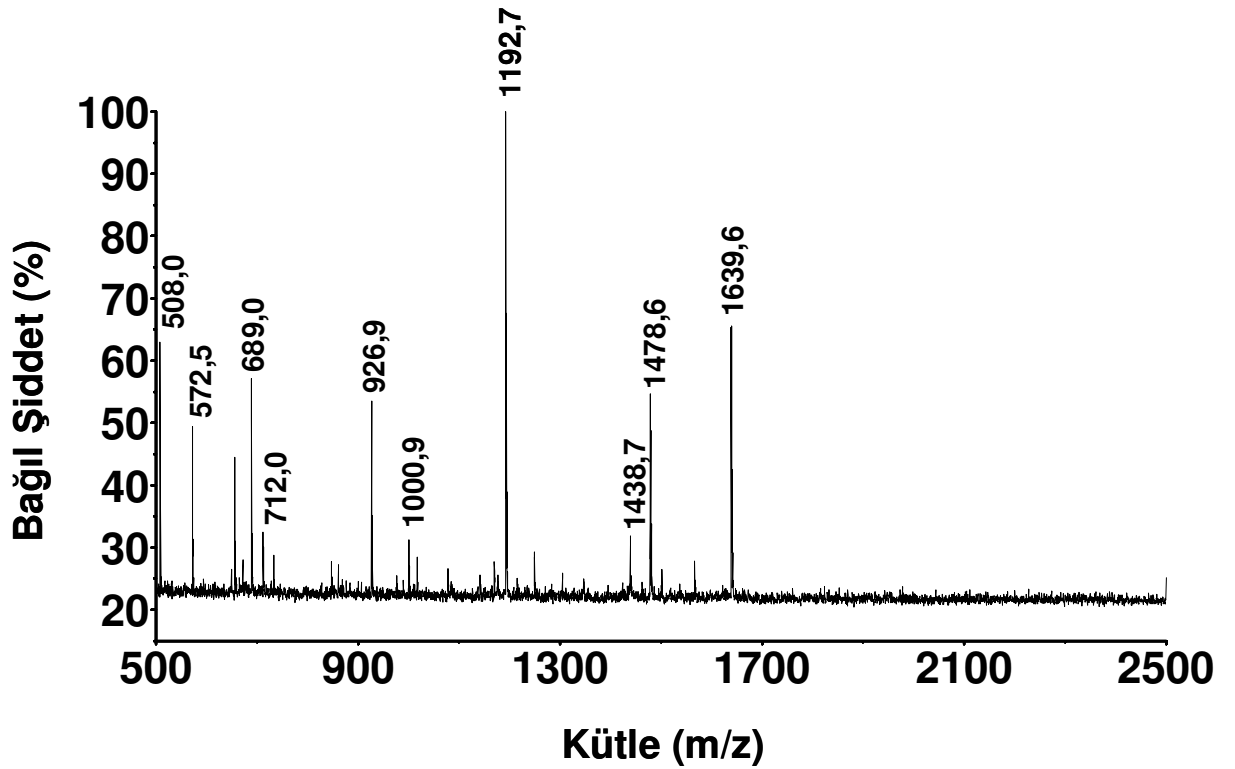
ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlardan, TEOS2 ve TEOS4 jellerine, tripsin tutuklanması işleminin gerçekleştirilemediği ve yalnızca yüzeyde fiziksel olarak tutunduğu sonucuna varılmıştır. Yüzeydeki bu tripsinin, bir sefer kullanımdan ve yıkamalardan sonra, yapıdan uzaklaştığı sonucuna varılmıştır. Şekil 4.21 ve Şekil 4.23’de verilen spektrumlar ise TEOS1 ve TEOS3 jellerinin BSA parçalama işlemini gerçekleştirmeye devam ettiğini gördük.



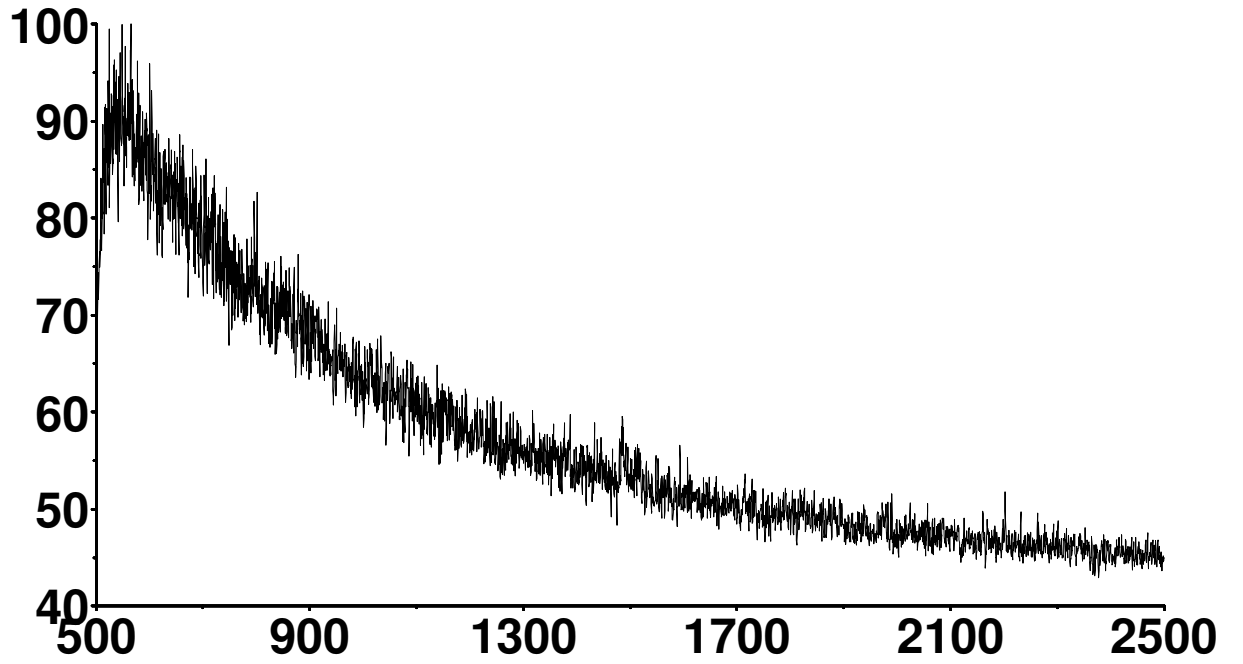
Şekil 4.21. TEOS1 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.



Şekil 4.22. TEOS2 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.

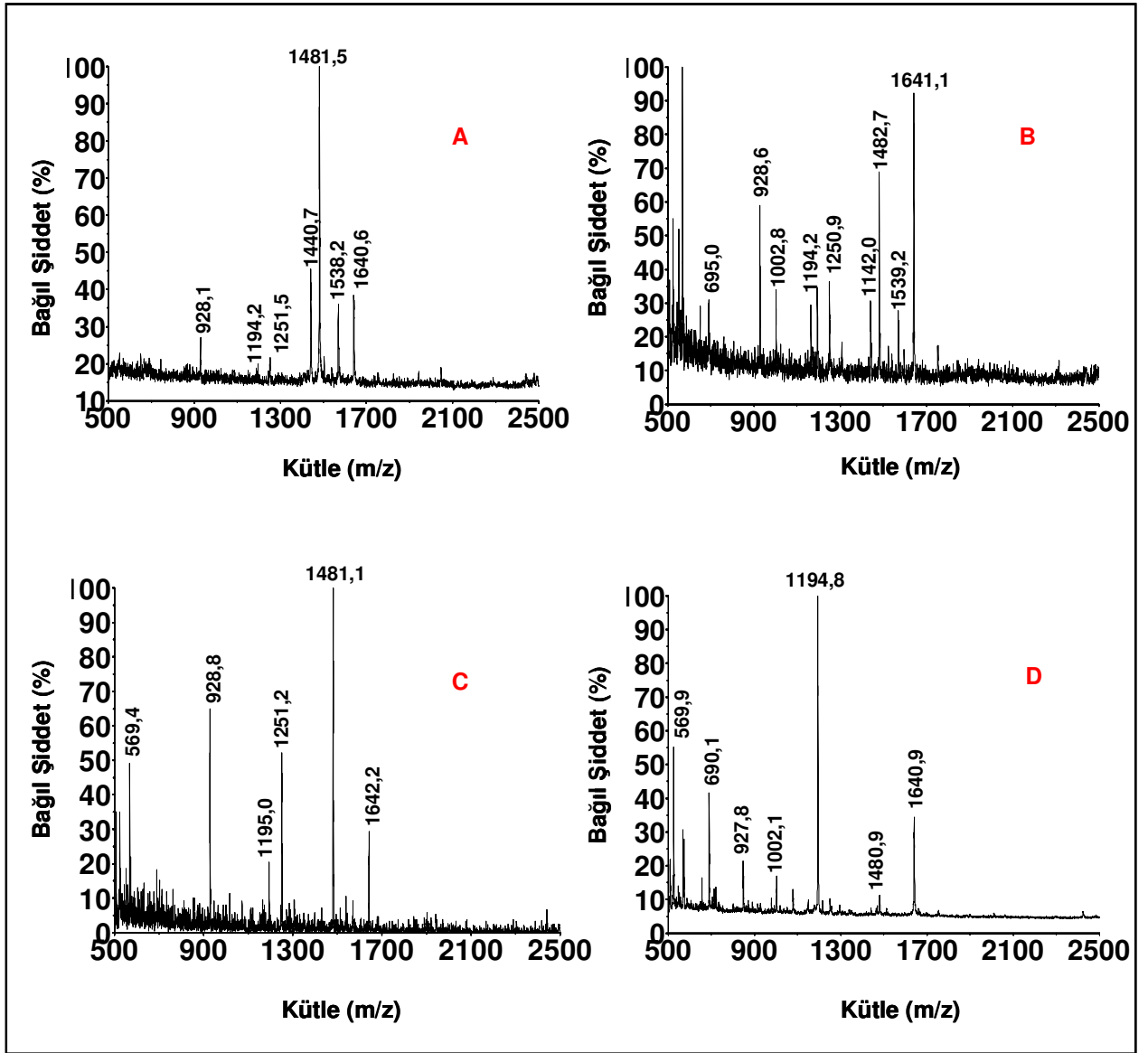


Şekil 4.23. TEOS3 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.



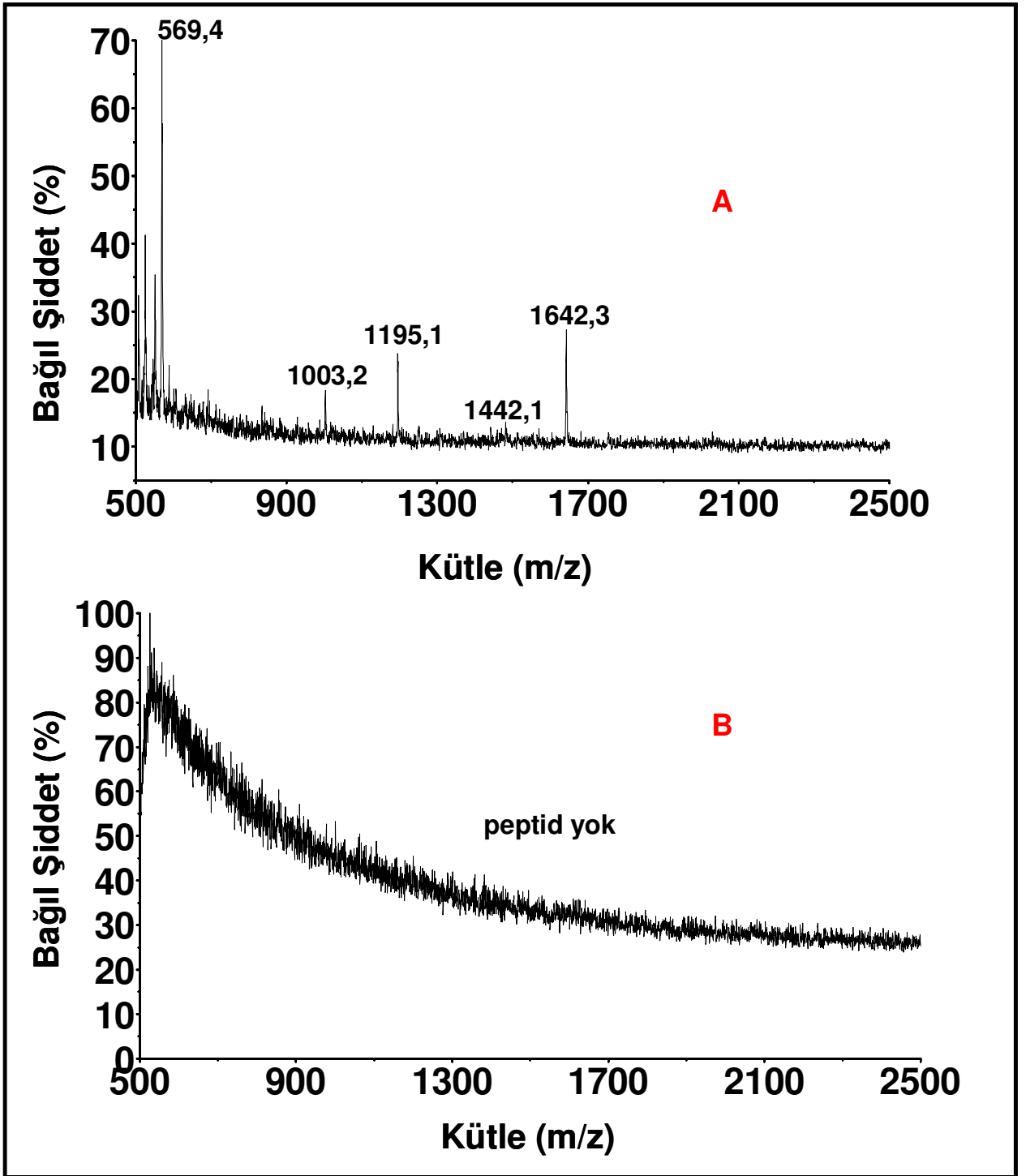
Şekil 4.24. TEOS4 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.

Yapılan deneyler sonucunda, BSA'yı peptid ürünlerine parçalama işleminin, TEOS1 jelinin kullanıldığı çalışmalarda en etkin şekilde gerçekleştirildiği görülmüştür ve sol-jel yapısı içerisine tutuklanan tripsin molekülünün tekrar tekrar kullanılabilirdiği gösterilmiştir. Tripsin tutuklanmış TEOS1 sol-jeli, ardışık olarak 10 kez BSA proteininin peptid ürünlerine parçalanması işlemi için kullanılmıştır ve sol-jel yapısı içerisine tutuklanan tripsin molekülünün aktivitesini yaklaşık 6 ay kadar koruduğu gözlenmiştir. TEOS1 sol-jelinin tekrar tekrar kullanımını gösteren, BSA peptid ürünlerine ait MALDI-MS spektrumları Şekil 4.25'de verilmiştir.



Şekil 4.25. TEOS1 sol-jelinin BSA parçalam çözeltiilerinden elde edilen MALDI-Kütle spektrumları. (A) 3. parçalam çözeltisi, (B) 5. parçalam çözeltisi, (C) 8. parçalam çözeltisi ve (D) 9. parçalam çözeltisi.

Farklı başlatıcı maddesi etkisinin araştırılması doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalarda, TEOS başlatıcısına ek olarak, TMOS başlatıcı monomerinin kullanıldığı, tripsin tutuklanmış bir sol-jel yapısı sentezlenmiştir. Bu TMOS sol-jeli kullanılarak gerçekleştirilen 1. ve 2. BSA parçalam işlemlerinin ana peptid çözeltiilerinin MALDI-MS spektrumları Şekil 4.26'da verilmiştir.

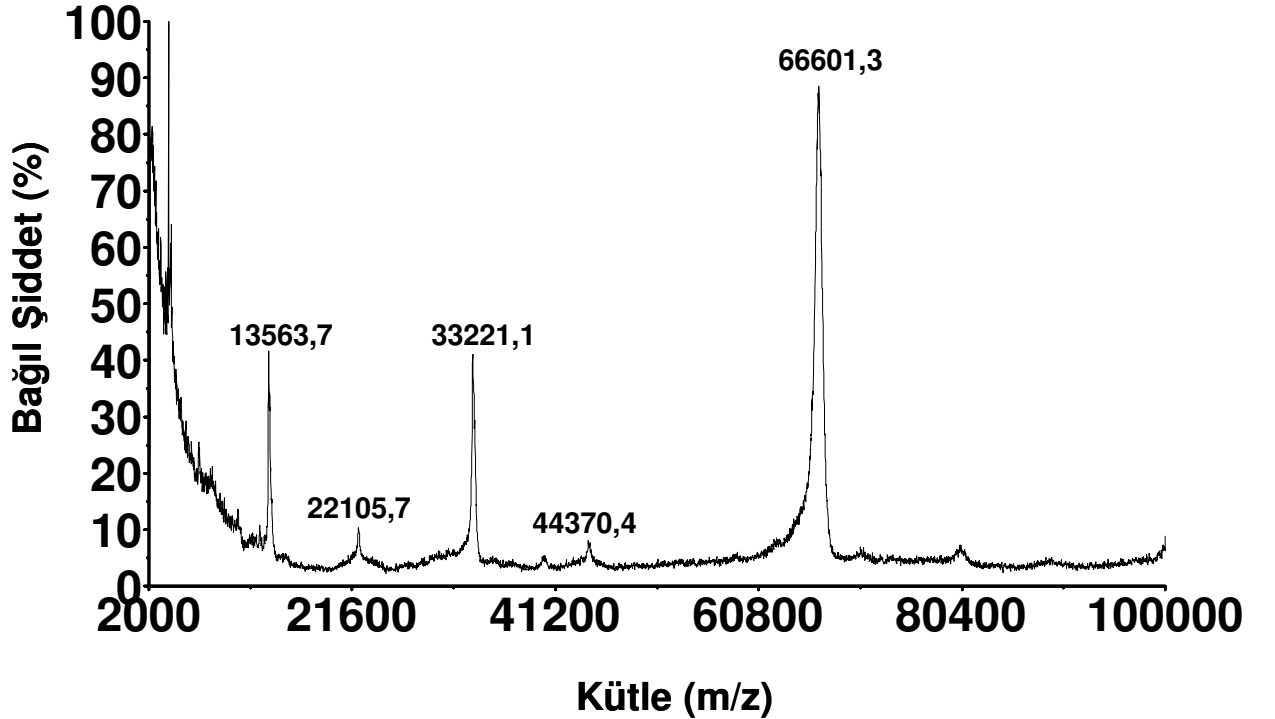


Şekil 4.26. TMOS sol-jelinin BSA parçalama çözeltilerinden alınan MALDI-Kütle spektrumları. (A) 1. parçalama çözeltisi ve (B) 2. parçalama çözeltisi.

TEOS1 ve TMOS sol-jellerinin, SEM görüntülerine bakıldığında, TMOS jellerinin camsı yapısının TEOS'un ince toz yapısından farklı oluşu, protein parçalama işlemleri için uygun olmayacağı öngörüsünde bulunmamıza neden olmuştur. TMOS sol-jellerinde gözenekliliğin gözlemlenmemesi tripsinin ancak yüzeye

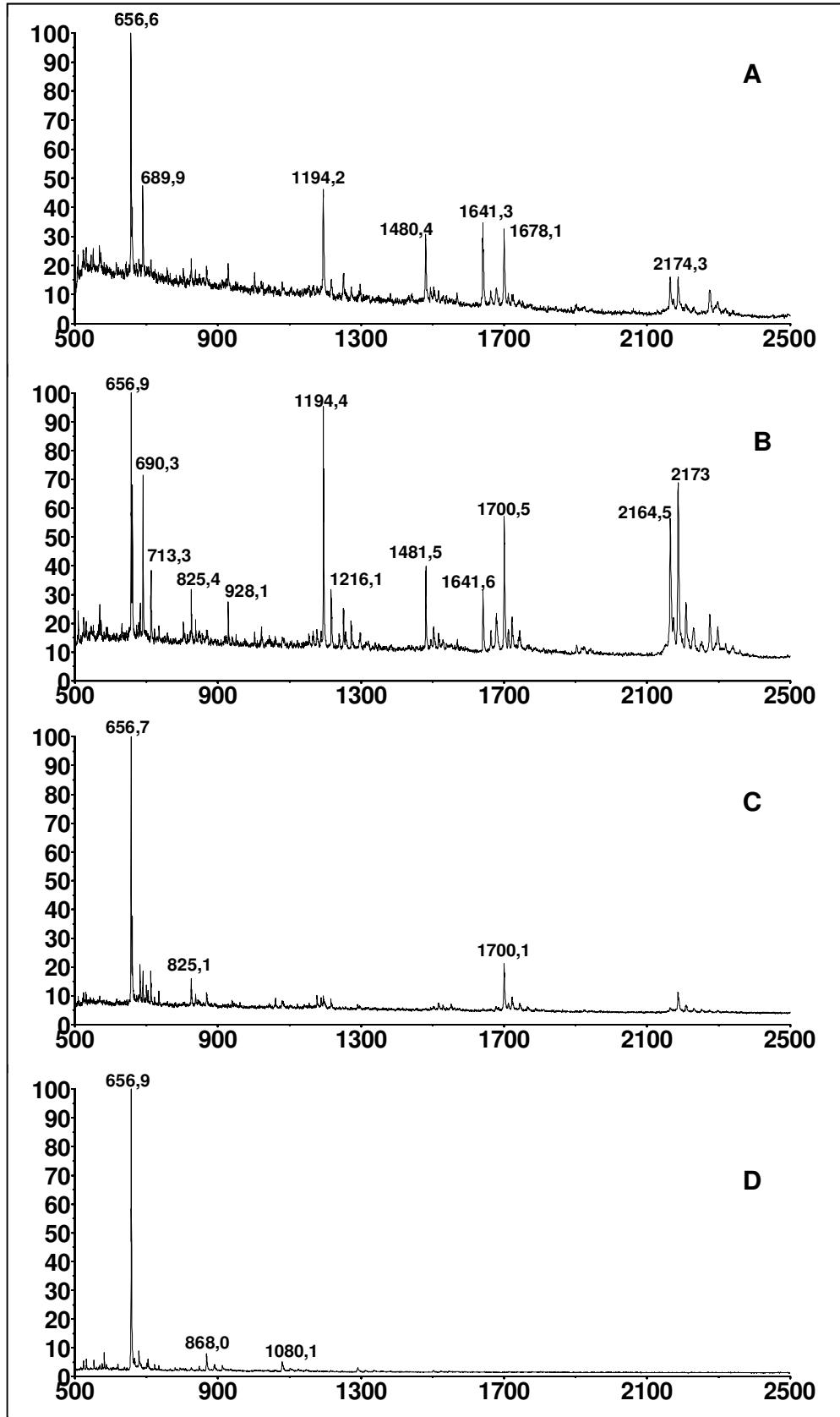
fiziksel tutunmasına neden olmuş ve ilk parçalanma işlemini kısıtlı ölçüde gerçekleştirdiği ve ikinci parçalanma işleminde ise hiç işlev görmediği tespit edilmiştir. Çünkü ikinci parçalama işleminden önce yapılan yıkamalar sonucunda yüzeyde fiziksel olarak tutunan tripsin enziminin yüzeyden tamamen uzaklaşması ve ortamda bulunmaması BSA'nın parçalanmasını mümkün kılmamaktadır.

MALDI- Kütle spektrometresi çalışmaları da incelendiğinde, tripsinin TMOS jeline immobilizasyonun etkin bir şekilde gerçekleştirilemediği ya da oluşan camsı jel yapısından kaynaklı, tutuklanan tripsin enziminin aktif bölgelerinin, protein çözeltileriyle etkileşemediğini göstermiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, BSA proteinini peptid ürünlerine parçalama işlemleri oldukça düşük bir verimle gerçekleştirilebilmiştir. Şekil 4.26.A' ya bakıldığında BSA'ya ait çok az sayıda peptid piki gözlenmektedir, ancak 2. BSA parçalama çözeltisinin MALDI- Kütle spektrumunda (Şekil 4.26.B), herhangi bir peptid parçalanma ürünü pikine rastlanmamaktadır. TMOS sol-jeli ile yapılan BSA parçalama çözeltilerinin Sinapinik asit matriksi ile yüksek molekül ağırlığı bölgesi kontrolü yapıldığında, BSA proteinin parçalanmaya uğramadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. TMOS sol-jelinin 1. BSA parçalama çözeltisinde yüksek molekül ağırlıklı bölgede alınan MALDI-Kütle spektrumu.

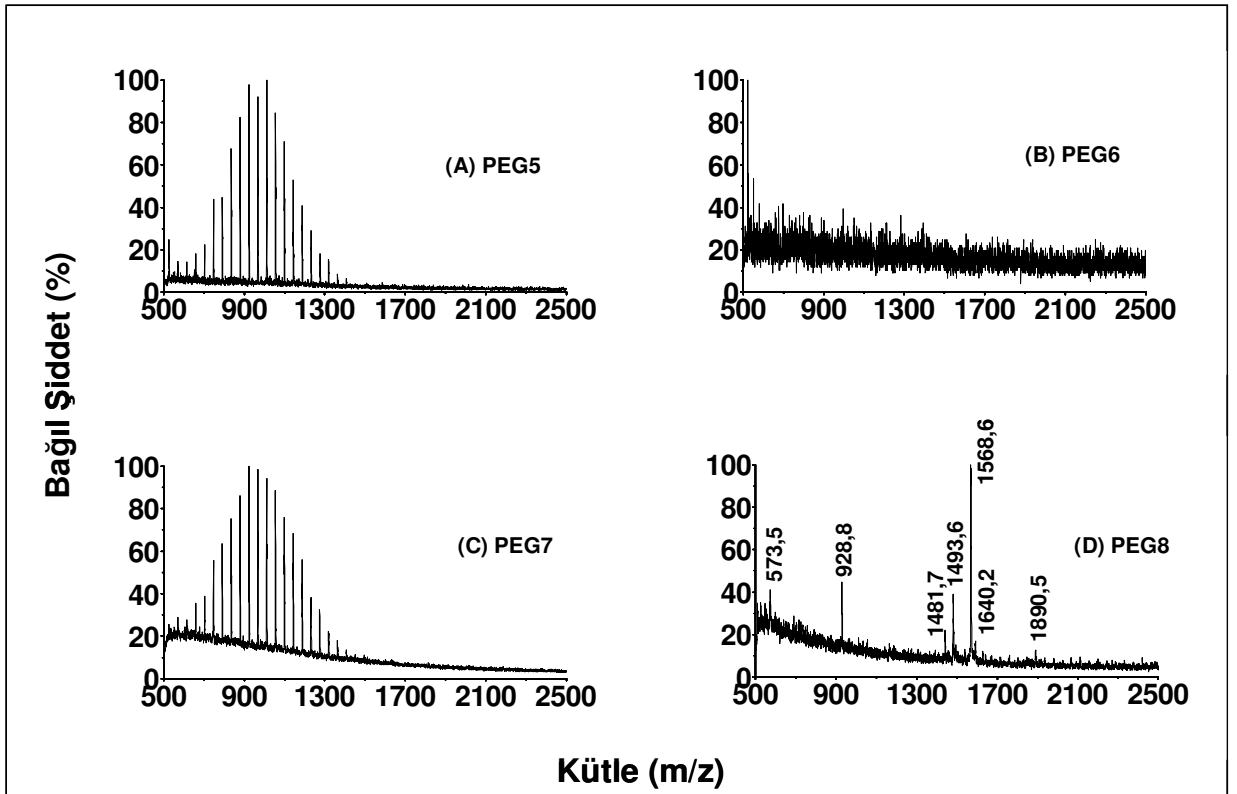
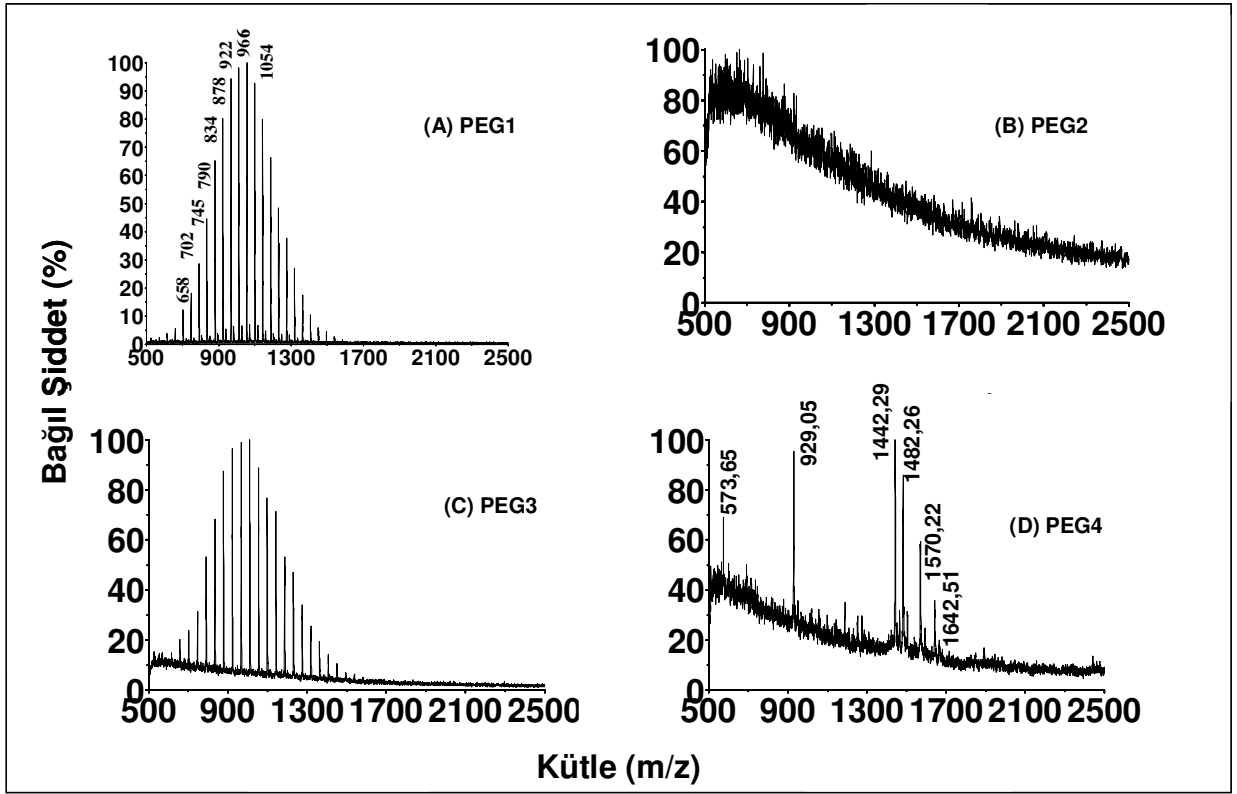
Protein miktarını azaltma çalışması: Yapılan deneysel çalışmalarda, her bir protein parçalama işlemi için yaklaşık olarak 2 mg tripsin tutuklanmış TEOS sol-jeli kullanılmıştır. 2 mg TEOS jeli içerisinde tutuklanmış tripsin miktarı 25-40 µg arasındadır ve bu doğrultuda protein parçalama işlemlerinde tripsin miktarının 10 katı olarak 250 µg BSA proteini kullanılmıştır. Daha az protein kullanılarak, parçalama işleminin gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceğinin denemeleri yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.28'de gösterilmiştir. Şekil 4.28.A'da BSA miktarı normal deneylerdeki miktarından 5 kat seyreltilerek 50 µg kullanılmış ve MALDI-Kütle spektrumuna bakıldığında BSA'ya ait peptid pikleri gözlenmiştir. Şekil 4.28.B'de 25 µg tripsine karşılık, BSA miktarı da 25 µg alınmış ve BSA peptidlerinin gözlenebildiği oldukça iyi bir spektrum elde edilmiştir. Şekil 4.28.C ve Şekil 4.28.D'de ise sırası ile 10 µg ve 5 µg BSA proteini kullanılmıştır. Bu spektrumlara bakıldığında, 10 ve 5 µg BSA miktarlarında elde edilen peptid parçalanma ürünlerinin derişimi, MALDI-Kütle spektrometresi ile tayin edilebilecek sınırların altında olmasından dolayı mümkün olmamaktadır. Ancak çözelti ortamında tripsinin yalnızca bir defa kullanılabildiği prosesle karşılaştırıldığında, bu çalışmada uygulanan işlemde, enzim miktarının çok daha azı tekrar tekrar kullanılarak, ayrıca gerekli olan protein miktarı da 20 kat düşürülerek çok uygun MALDI-Kütle spektrumları elde edilebilmektedir. Bu durum, tripsin enzimi kullanımının hem maliyetini çok azaltmakta, hem de az miktarda örnek proteinin yeterli olması ile, biyolojik sıvılardan kısıtlı miktarda elde edilebilen önemli proteinlerin dizilim analizlerinin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Böylece yeni proteinlerin tanımlanmasına veya proteinlerde olası modifikasyon ve mutasyonların ortaya çıkarılmasına yardımcı olacaktır.



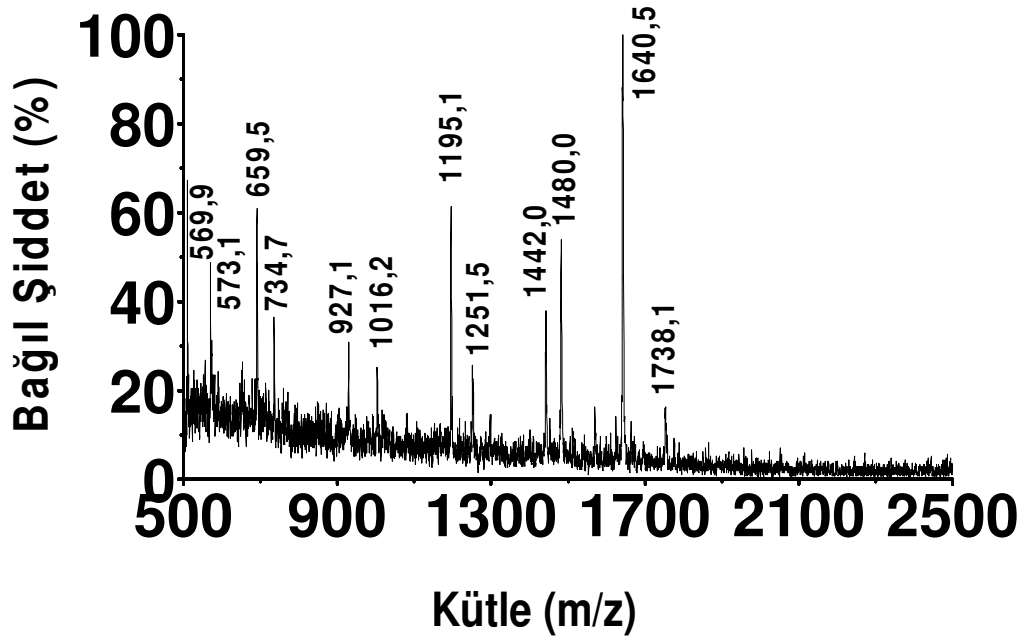
Şekil 4.28. TEOS1 sol-jeli ile gerçekleştirilen protein parçalama işleminde BSA miktarı azaltma çalışmasına ait MALDI-Kütle spektrumları. (A) 50 µg BSA, (B) 25 µg BSA (C) 10 µg BSA ve (D) 5 µg BSA.

Tripsin Tutkulanmış Sol-jellerin Sentezinde PEG Etkisi

Polietilen Glikol (PEG) kullanılarak sentezlenen sol-jellerin BSA parçalanması işleminde kullanımları incelendiğinde, en iyi sonuçları başlatıcı monomeri olarak TEOS'un kullanıldığı ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (Mw) 6000 olan PEG'in 0.6 mL kullanıldığı PEG8 sol-jelinin verdiğini tespit edilmiştir. Şekil 4.29'a baktığımızda, PEG1, PEG3, PEG5 ve PEG7 olarak isimlendirilen ve 1000 molekül ağırlığına sahip PEG ile sentezlenen sol-jellerde, BSA'ya ait peptid parçalanma ürünlerinin piklerine rastlanmamaktadır. Bu spektrumlarda yalnızca PEG1000 molekülünden kaynaklanan, farklı molekül ağırlığına sahip polimer zincirlerinin molekül ağırlığı dağılımı görülmektedir. Bu dağılım beklendiği üzere, 500-1500 Da aralığındadır ve farklı molekül ağırlığına sahip PEG polimer zincirleri arasındaki kütle farkı ise bize PEG'in 44 Da kütleli tekrar eden birimini vermektedir. Burada PEG1000'e ait piklerin MALDI-Kütle spektrumunda görülmesi PEG1000'in sol-jel yapısına katılmadığını ve serbest halde sol-jel içerisine tutuklanmış veya yüzeyde fiziksel olarak tutuklanmasından kaynaklandığını göstermektedir. Yine Şekil 4.29'da PEG4, PEG8 şeklinde isimlendirilen, TEOS başlatıcısı ve PEG6000 kullanılarak sentezlenen sol-jellerin kullanılmasıyla yapılan BSA parçalama deneylerinde, peptid parçalanma ürünlerine ait piklerin varlığı gözlemlenmektedir. PEG8 sol-jelinin yıkamalar sonrasında tekrar kullanımına bakıldığında ise BSA parçalama işlemine devam edebildiği de Şekil 4.30'dan görülmektedir.



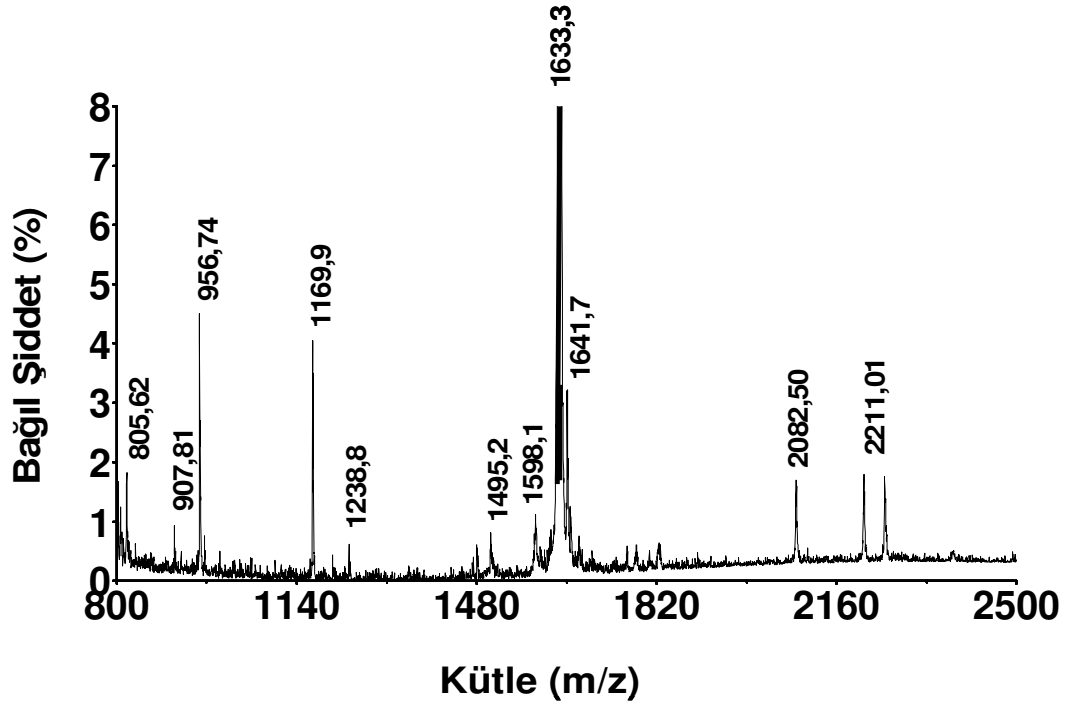
Şekil 4.29. PEG kullanılarak sentezlenen sol-jellerin 1. BSA parçalama çözeltilerine ait MALDI-Kütle spektrumları.



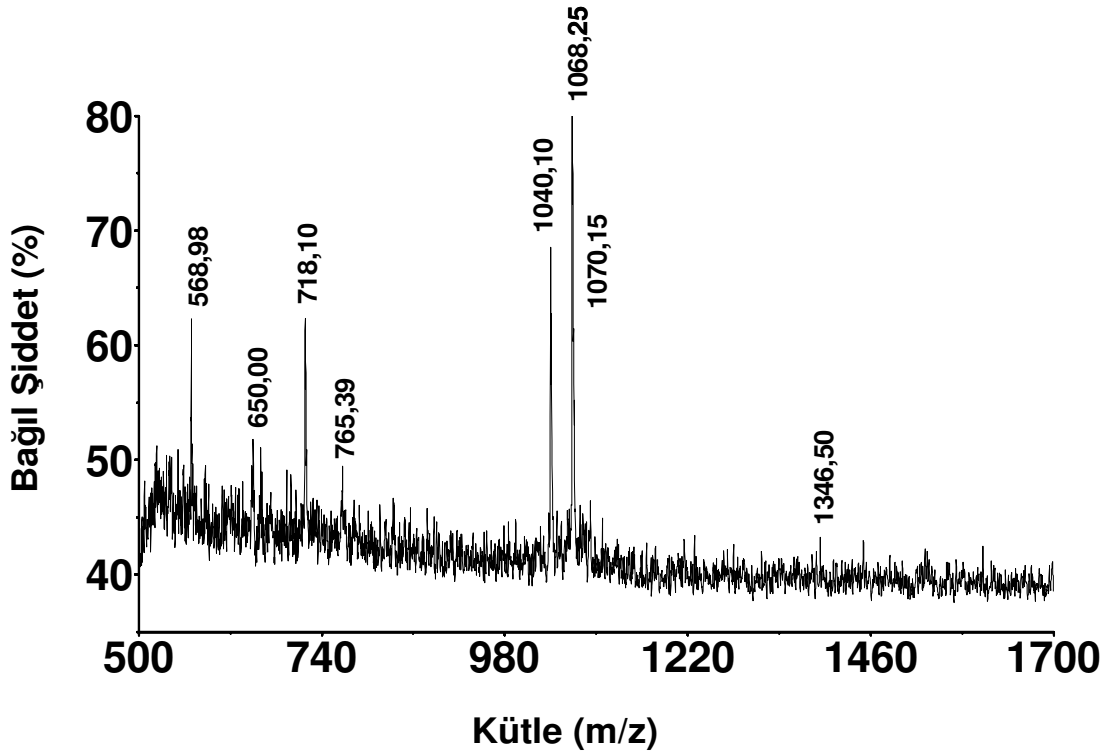
Şekil 4.30. PEG8 sol-jelinin 2. BSA parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.

Çalışmada gerçekleştirilen bir diğer kısım ise BSA proteini dışında başka proteinlerin de peptid ürünlerine parçalama işlemini sonucunda, bu proteinlere ait peptid kütle parmakizi analizlerini gerçekleştirebilmektir. Bu doğrultuda seçilen iki farklı proteinin daha peptid kütle parmakizi analizleri yapılmıştır. Sitokrom C ve Ubiquitin proteinlerinin parçalanması işlemi, PEG8 kodlu tripsin tutuklanmış sol-jel kullanılarak yapılmıştır ve elde edilen MALDI-MS spektrumları Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’de verilmiştir.

Şekil 4.31’de görülen Sitokrom C proteininin parçalanması sonucu oluşan peptid çözeltisinin MALDI-MS spektrumunda görülen 956, 1170, 1238, 1495, 1633, 1641, 2082, 2211 Da kütleli pikler Sitokrom C proteinine özgü parçalanma ürünleridir. Benzer şekilde Şekil 4.32’deki Ubiquitin proteinine ait peptid parçalanma ürünleri ise 650, 718, 765, 1040, 1068, 1070 Da ağırlığındaki piklerdir. Proteinlerin, tripsin enzimi ile peptid ürünlerine parçalanması sonucu oluşacak ürünlerin teorik olarak türetildiği çeşitli veritabanları bulunmaktadır. Elde edilen deneysel sonuçlar bu veritabanlarındaki listelerle kıyaslanmaktadır. Expasy (<http://www.expasy.org/>) veritabanından elde edilmiş olan peptid parçalanma ürünlerinin listesi EK2’de verilmiştir.

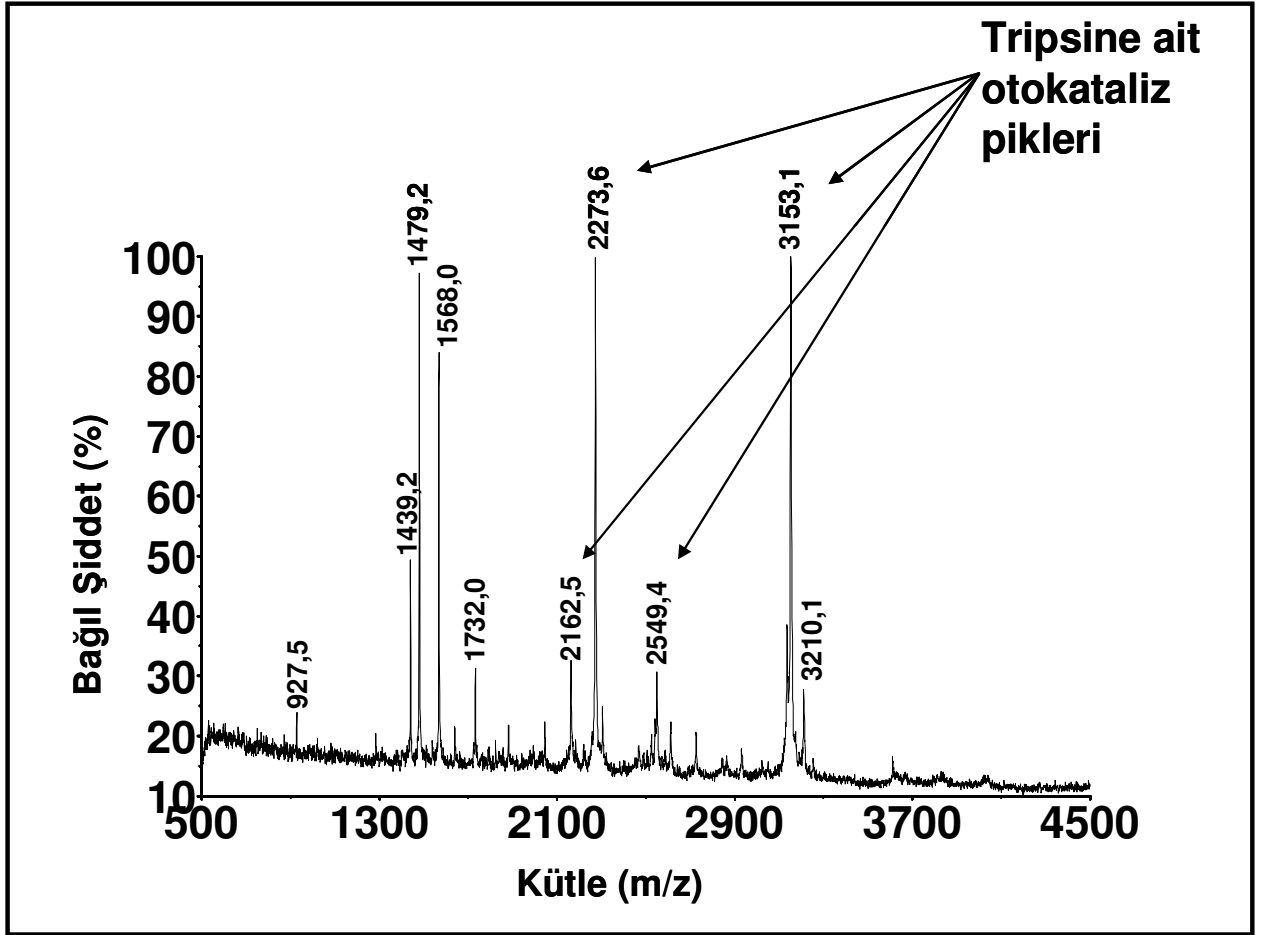


Şekil 4.31. PEG8 sol-jelinin Sitokrom C parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.

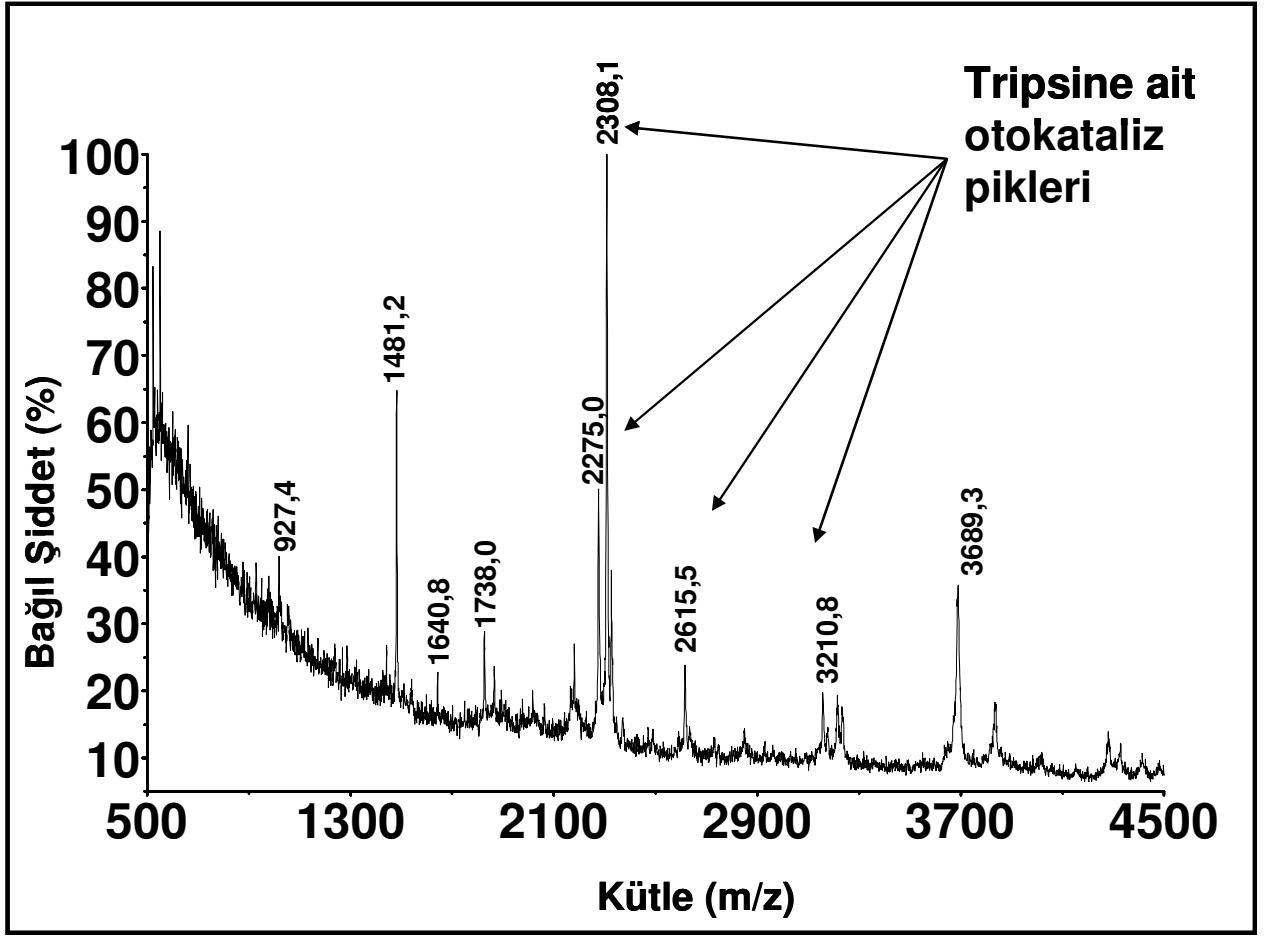


Şekil 4.32. PEG8 sol-jelinin Ubiquitin parçalama çözeltisine ait MALDI-Kütle spektrumu.

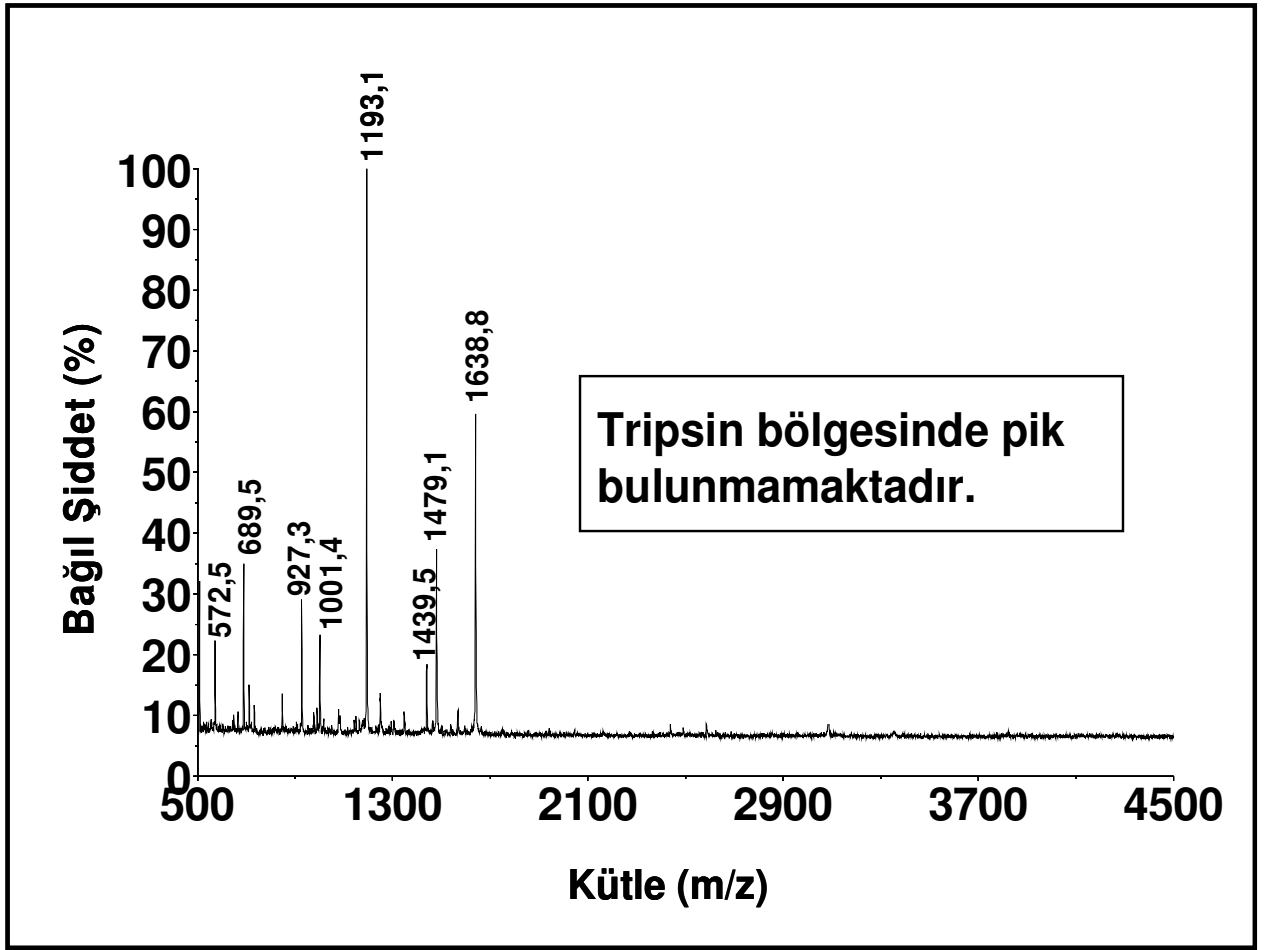
Deneysel çalışmaların son aşamasında ise, sol-jel yapısına tutuklanmış tripsin ile gerçekleştirilen BSA parçalanmasına ek olarak, serbest çözeltideki tripsin parçalaması ve poliakrilamid jel elektroforez sonrası ayrılıp saflaştırılan BSA proteininin jel içerisinde parçalanması işlemleri de gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçlarına bakıldığında, çözeltide parçalama ve jelde parçalama işlemlerinde tripsin otolizinden kaynaklanan, tripsine ait peptid piklerine sıkça rastlanmaktadır. Ancak sol-jel yapısı içerisinde tutuklanmış tripsin ile gerçekleştirilen protein parçalanmasında tripsine ait peptidler gözlenmemektedir. Bu sonuç peptid parçalanma ürünleri belirlenmeye çalışılan proteinin analizinde oldukça büyük güçlükler ortaya çıkaran bu problemin giderildiği anlamını taşımaktadır.



Şekil 4.33. Jel elektroforez yöntemiyle saflaştırılan ve Poliakrilamid jel içerisinde kalan BSA proteininin, serbest tripsin enzimi ile parçalanması sonucu elde edilen MALDI-Kütle spektrumu.



Şekil 4.34. BSA proteininin çözelti içerisinde serbest tripsin enzimi ile parçalanması sonucu elde edilen çözeltiden alınan MALDI-Kütle spektrumu.



Şekil 4.35. Sol-jel yapısı içerisine tutuklanmış tripsin enzimi ile gerçekleştirilen BSA parçalama işleminden sonra elde edilen çözeltiden alınan MALDI-Kütle spektrumu.

Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Şekil 4.35’de verilen ve sırası ile poliakrilamid jel içerisinde parçalama, çözeltide parçalama ve sol-jel yapısına tutuklanmış tripsin kullanılarak gerçekleştirilen protein parçalama işlemlerinde, tripsine ait otokataliz ürünlerinin yalnızca Şekil 4.35’deki sol-jel yapısına tutuklanmış tripsin ile gerçekleştirilen protein parçalama işleminde görülmeyeceği açıktır. Bu sonuçlara bakıldığında, çalışmanın temel amaçlarından biri olan tripsinin otokatalitik etkisinin giderildiği anlaşılmaktadır.

5. SONUÇLAR

Yapılan çalışmada, ilk olarak farklı başlatıcı maddesi, farklı katalizör ve değişik miktarlarda alkol kullanılarak sentezlenen bir dizi sol-jel materyaline tripsin tutuklanması işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürünler, MALDI-MS tekniği kullanılarak, proteinlerin peptit kütle parmakizi analizlerinin elde edilmesinde kullanılmıştır.

En etkin ve verimli peptid kütle parmakizi analizini gerçekleştirebilmek amacıyla, uygun parametrelere sahip tripsin tutuklanmış sol-jel malzemelerinin sentezlenmesi doğrultusunda, başlatıcı madde etkisi araştırılmış ve karşılaştırmalı olarak yapılan deneyler sonucunda TEOS başlatıcı monomerinin, TMOS başlatıcı monomerine göre daha uygun olduğu saptanmıştır. Yine aynı amaç doğrultusunda incelenen katalizör etkisinde ise NaOH katalizörü yerine, NaF katalizinde sentezlenen sol-jellerin daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. NaF konsantrasyonunun, reaksiyon süresini etkilemesi ile sol-jel materyalinin gözenek boyutunu etkilediği ve bununla birlikte tripsin biyomolekülünün aktifliğini devam ettirebilmesi için gerekli olan uygun pH ortamını sağladığı belirlenmiştir.

Sentezlenen sol-jellerde alkol miktarının gözenek büyüklüğüne etkileri, tutuklanan tripsin enziminin aktivitesine etkileriyle araştırılmıştır. Farklı alkol miktarları kullanılarak sentezlenen sol-jeller için, Taramalı elektron Mikroskopisinde (SEM) farklı yüzey özellikleri saptanmıştır. Ayrıca tripsin tutuklanmış bu sol-jellerle yapılan enzimatik parçalama deneyleri sonucunda aynı proteinlerin farklı peptit türlerine parçalandıkları gözlenmiştir. Bu farklılıklarda alkol miktarına bağlı olarak sol-jelin gözenek yapısında değişiklik meydana geldiğini ve tripsin enziminin tutuklanabilirliğine ve tutuklanan enzimlerin yararlanılabilirliğine etki ettiğini göstermiştir.

Sol-jel sentezlerinde, alkoksit ve suyun karışabilmesi için kullanılan alkol miktarı ve türünün yapıya etkileri, PEG kullanılarak daha detaylı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda yapılan sentezlerin SEM analizleri ve MALDI-MS sonuçları incelendiğinde, en iyi sonuçları TEOS başlatıcısı ile birlikte PEG6000'in kullanıldığı sol-jeller vermiştir.

SEM fotoğraflarından, tripsin tutuklanmamış TEOS sol-jellerinin ortalama gözenek boyutları aynı ve yaklaşık 800 nm çapında partiküller oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak tripsinli TEOS sol-jellerinde, enzim etrafında oluşan kafes ve örgü yapıları izlenmiştir. TMOS sol-jelinin SEM elektron mikrografı incelendiğinde yapının oldukça sert ve gözeneksiz olduğu görülmüştür.

Tripsin enziminin sol-jel yapısına hapsoldüğü FT-IR spektrumlarından da teyit edilmiştir.

Yapıların karakterizasyonunun ve tripsinin tutuklanabilirliğinin daha detaylı açıklanabilmesi için TGA termogramları elde edilmiştir. Tripsinin sol-jel yapısına tutuklanabildiği, tripsinin ağırlık kaybından ve maksimum bozunma sıcaklıklarından izlenmiştir. Yine TGA eğrilerinden, tripsin tutuklanmış sol-jellerin yıkama işlemleri sonrasında yüzeyde tutunmuş olan bir miktar enzimin kaybedildiği de gözlenmiştir.

Çalışmanın temel hedefleri kapsamında gerçekleştirilen ve proteomiks yaklaşımlara çeşitli avantajlar sağlaması için üretilen tripsin tutuklanmış sol-jel materyalleri, çeşitli proteinlerin peptid parçalanma ürünlerinin elde edilmesinde kullanılmış ve oluşan peptidler MALDI-Kütle spektrometresi ile tayin edilmiştir.

Sol-jel yapılarına uygun bir şekilde tutuklanmış olan tripsin enziminin etkinliğini yaklaşık 7-8 aylık bir periyotta koruduğu gözlenmiştir. Bu zaman dilimi içerisinde, aynı tripsin tutuklanmış sol-jelin, protein parçalama işlemi için tekrar tekrar kullanılabilmesi sağlanmıştır. Bu şekilde, tutuklanmış tripsin enziminin proteomiks çalışmalarda kullanımı, çözelti ortamında tripsinin tek bir sefer kullanılabildiği parçalama işlemi ile kıyaslandığında, çalışmaların maliyeti açısından önemli bir avantaj olarak görülmektedir.

Çalışmalarda kullanılan tripsin tutuklanmış sol-jeller, protein parçalama işlemi gerçekleştirildikten sonra, yıkanarak bir sonraki parçalama işlemi için hazır hale getirilmiştir. Ancak bu aşamada, oluşan peptidlerin bir kısmı hidrofobisitelerine bağlı olarak ve sol-jel materyaline ilgilerinden dolayı suyla tamamen yüzeyden uzaklaştırılamamıştır ve yıkama işlemi sayısı yüzeyde kalan peptidleri minimuma indirecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu sorunun giderilmesi amacıyla, ACN:TFA yıkamalarıyla peptidlerin yüzeyden uzaklaştırılmasına çalışılmış, ancak bu kez de

enzimde meydana gelen bozunma ve aktivite kaybından dolayı etkin bir şekilde bu sorun giderilememiştir.

Enzimin tekrar tekrar kullanılabilmesi avantajının yanı sıra, çözelti ortamında gerçekleştirilen protein parçalama işlemine göre çok daha az enzim kullanılarak, miktar olarak çok daha az proteinin, peptid parçalanma ürünlerine parçalanabilmesi sağlanmıştır.

Sol-jel yapısına tutuklanmış tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilen protein parçalama işleminde, diğer parçalama işlemleri olan çözeltide ve poliakrilamid jel içerisinde olduğu gibi, tripsine ait otokatalitik ürünlere rastlanmamıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aelion, R., Loebel, A. and Eirich, F., 1950, Hydrolysis of ethylsilicate., Journal of the American Chemical Society 72 :5705– 5712.
- Alagöz, D., 2007, β -Galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu Ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi ve Glukoz İzomerizasyonunda Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez danışmanı Prof.Dr. S. Seyhan TÜKEL
- Anderson, N.G. and Anderson, N.L., 1996, Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future, Electrophoresis 17, 443–453.
- Avnir, D., Ottolenghi, M., Braun S. and Zusman, R., 1997, Doped Sol-Gel Glasses for Obtaining Chemical Interactions, U.S. Patent 5, 650,311, July 22.
- Avnir, D. and Braun, S., 1996, Biochemical Aspects of Sol-gel Science and Technology, Kluwer Academic Publishers.
- Avnir, D., Braun, S., Lev, O. and Ottolenghi, M., 1994, Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials., Chemistry of Materials 6, 1605-1614.
- Badjic, J.D. and Kostic N.M., 2000, Unexpected interactions between sol-gel glass and guest molecules: extraction of aromatic hydrocarbons into polar silica from hydrophobic solvents, J. Phys. Chem. B 104, 11081-11087.
- Barreau, J.Y. *et al.*, 1994, Fixation and immunoreactivity of parasitic protozoa in sol-gel matrices, Comptes Rendus Acad. Sci. Ser III 317, 653–657.
- Biberoğlu, G., 2003, Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı, T. Klin. J. Med. Sci., 23:491-498.
- Branyik, T. and Kuncova, G., 2000, Changes in phenol oxidation rate of a mixed microbial culture caused by sol-gel immobilization, Biotechnology Letters 22, 555-560.

- Braun, S., Rappoport, S., Shtelzer, S., Avnir, D. and Ottolenghi M., 1992, Biocatalysis by Sol-Gel Entrapped Enzymes, *J. Non-Cryst. Solids*, 147, 739-743.
- Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D. and Ottolenghi M., 1990, Biochemically Active Sol-Gel Glasses: The Trapping of Enzymes, *Materials Lett.*, 10, 1-5.
- Brinker, C.J. and Scherer, G.W., 1990, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Pres, New York, 908p.
- Brinker, C.J. and Scherer, G.W., 1985, Sol-Gel Glass: I. Gelation and Gel Structure *J. Non-Crystalline Solids*, 70, 301-322.
- Carturan, G. *et al.*, 1999, Production of valuable drugs from plant cells immobilized by hybrid sol-gel SiO₂, *J. Sol-gel Sci. Technol.* 13, 273–276.
- Carturan, G., Dal Monte, R., Pressi, G., Secondin, S. and Verza, P., 1998, Production of Valuable Drugs from Plant Cells Immobilized by Hybrid Sol-Gel SiO₂, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 13, 273-276.
- Chang, T.M.S., 1976, Microencapsulation of enzymes and biologicals, K. Mosbach Methods, *Methods in Enzymology*. pp:201–218, Academic Pres, New York.
- Chen, Z. *et al.*, 1996, Phycobiliproteins encapsulated in sol-gel glass, *J. Sol-gel Sci. Technol.* 7, 99–108.
- Chibata, I., 1978, *Immobilized Enzymes., Research and Development.*, Kodansha, Tokyo, 284p.
- Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O.M.M. and Livage, J., 2001, Sol-gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes, *Journal of Materials Chemistry* 11, 2039-2044.
- Collinson, M.M., 1999, Sol-gel strategies for the preparation of selective materials for chemical analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29, 289-311.

- Cotter, R.J., 1997, Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research, Chap. 2, in ACS Professional Reference Books, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 19–45.
- Cremonesi, P., Angiuro, L.D., 1983, Kinetic and Thermal Characteristics of Enzyme-Graft Copolymers, *Biotechnology and Bioengineering*, 25 (3), 735-744.
- Çal, A., 2008, Düşük Molekül Ağırlıklı Polivinilpirolidonun Matriks Yardımlı-Lazer Desorpsiyon İyonlaşmalı Kütle Spektrometresi İle İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Danışmanı: Prof.Dr. Bekir Salih, Ankara.
- Çırakoğlu, B., 2002, İnsan genomu projesi, *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayfa. 8-11.
- Dickey, F.H., 1955, Specific adsorption, *J. Phys. Chem.* 59, 695-707.
- Ebelman, J.J., 1846, *Ann.* 57, 331.
- Ekici, K. ve Alişarlı, M., 2003, Polyakrilamid Jel İzoelektrik Fokuslama Tekniğinin (PAGIF) Et Türlerinin Ayırımında Kullanılması, *YYÜ Vet Fak Derg.*, 14 (2):102-106.
- Ellerby, L.M., Nishida, C.R., Nishida, F., Yamanaka, S.A., Dunn, B., Valentine, J.S. and Zink, J.I., 1992, Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method, *Science*, 255, 1113-1115.
- Erdik, E., 1998, *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, Gazi Kitabevi, 2.Baskı, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, 82-385.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M., 1989, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, 246, 64-71.
- Garcia, M.E.D. and Laino, B.R., 2005, Molecular Imprinting in Sol-Gel Materials: Recent Developments and Applications, *Spain Microchim. Acta*, 149, 19–36.

- Gevaert, K. and Vandekerckhove, J., 2000, Protein identification methods in proteomics, *Electrophoresis* 21, 1145-1154.
- Gheyi, T., 2005, Structural Characterization of Proteins and Peptides Using Mass Spectrometry, Ph.D. Thesis, The University of Memphis, Major Professor: Chhabil Dass.
- Gill, I., 2001, Bio-doped nanocomposite polymers: Sol-Gel bioencapsulates, *Chem. Mater.*, 13, 3404-3421.
- Gill, I. and Ballesteros, A., 2000, Bioencapsulation within synthetic polymers (Part1): sol-gel encapsulated biologicals., *Trends in Biotechnology*, 18, 282-296.
- Gill, I. and Ballesteros, A., 1998, Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane and hybrid sol-gel polymers: an efficient and generic approach, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 8587–8598.
- Graves, P.R. and Haystead, T.A.J., 2002, Molecular Biologist's Guide to Proteomics, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar. 2002, p. 39–63, Vol. 66, No:1.
- Harris, M.T., Brunson, R.R. and Byers, C.H., 1990, The base-catalyzed hydrolysis and condensation reactions of dilute and concentrated TEOS solutions, *J. Non-Cryst. Solid*, 121, 397-403.
- Hench, L.L., 1998, Biomaterials: a forecast for the future., *Biomaterials*, 19, 1419-1423.
- Hench, L.L., West, J.K., 1990, The solgel process, *Chem. Rev.*, 90, 35-40.
- Hoffmann, E.D. and Stroobant, V., 2002, Mass spectrometry: principles and applications, 2nd. Ed., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 479p.
- Hoffmann, E.D., Charette, J., Stroobant, V., 1996, Mass Spectrometry Principles and Applications, Masson, Paris: John Wiley & Sons Ltd. 91-93.

- Hüsing, N. and Schubert, U., 1998, Aerogels – airy materials: chemistry, structure and properties, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 37, 22–37.
- James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., Gonnet, G., 1993, Protein identification by mass profile fingerprinting, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195, 58-64.
- Jin, W. and Brennan, J.D., 2002, Properties and applications of proteins encapsulated within sol–gel derived materials, *Analytica Chimica Acta* 461, 1–36.
- Kandimalla, V.B., Tripathi, V.S. and Ju, H., 2006, Immobilization of Biomolecules in Sol–Gels: Biological and Analytical Applications, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36:73–106.
- Karas, M., Hillenkamp F., 1988, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 1000 Daltons, *Anal Chem.* 60:2299.
- Kaufmann, C.G. and Mandelbaum, R.T., 1996, Entrapment of atrazine chlorohydrolase in sol–gel glass matrix, *J. Biotechnol.* 51, 219–225.
- Kavaklı, C., 2001, Cyclam içeren çapraz bağlı mikrokürelerin karakterizasyonu ve metal iyonlarının adsorpsiyonundaki seçiciliği, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Tez danışmanı Prof. Dr. Bekir Salih.
- Keefer, K.D., 1990, Silicon Based Polymer Science: A Comprehensive Resource; J.M. Zeigler and F.W.G. Fearon (eds.), *ACS Advances in Chemistry Ser. No. 224*, American Chemical Society: Washington, DC, pp. 227-240.
- Kennedy, J.F., Cabral J.M.S. and Scouten W.H., 1983, Immobilized Enzymes in Solid Phase Biochemistry, Chemical Analysis, John Wiley and Sons. New York, p. 253–392.
- Kinter, M. and Sherman, N.E., 2000, Protein Sequencing and Identification using tandem mass spectrometry, Wiley-Interscience, Inc, New York.

- Lahav, M., Kharitonov, A.B., Katz, O., Kunitake, T. and Willner, I., 2001, Tailored Chemosensors for Chloroaromatic Acids Using Molecular-Imprinted TiO₂-Thin Films on Ion-Sensitive Field-Effect Transistors, *Anal. Chem.*, 73, 720-723.
- Lev, O. et al., 1995, Organically modified sol-gel sensors, *Analytical Chemistry*., 67(1), 22A-30A.
- Li, J. *et al.*, 1998, Silica sol-gel immobilized amperometric enzyme electrode for peroxide determination in the organic phase, *J. Electroanal. Chem*, 448, 69-77.
- Lin, J. and Brown, C.W., 1997, Sol-gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing, *Trends Anal. Chem.* 16, 200-211.
- Livage, J., Coradin, T. and Roux, C., 2001, Encapsulation of Biomolecules in silica gels, *Journal of Physics: Condensed Matter* 13, R673-R691.
- Livage, J., Roux, C., Da Costa, J.M., Desportes, L. and Quinson, J.F., 1996, Immunoassays in sol-gel matrices, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 7, 45-51.
- Luisi, P.L. and Magid, L.J., 1986, Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions, *Critical Reviews in Biochemistry* 20 (4), 409-474.
- Mackenzie, J.D., 2003, Sol-Gel research – Achievements Since 1981 and Prospects for the Future, *Journal of Sol-gel Science and Technology* 26, 23-27.
- Mann, M., Hojrup, P., Roepstorff, P., 1993, Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases, *Biol. Mass. Spectrom.*, 22, 338-345.
- Manz, A., Pamme, N. and Iossifidis, D., 2003, *Bioanalytical Chemistry*, World Scientific Publishing Company, Singapore, 188p.
- Marko-Varga, G., 2004, Proteomics principles and Challenges, *Pure Appl.Chem.*, 76 (4):829-837.

- Marx, S. and Liron, Z., 2001, Molecular Imprinting in Thin Films of Organic–Inorganic Hybrid Sol–Gel and Acrylic Polymers, *Chem. Mater.*, 13, 3624–3630.
- Nassif, N., Bouvet, O., Rager, M.N., Roux, C., Coradin, T. and Livage, J., 2002, Living Bacteria in silica gels, *Nature Materials* 1, 42–44.
- Nelson, J.M. and Griffen, E.G., 1916, Adsorption of Invertase, *Journal of the American Chemical Society*, 38: 1109–1115.
- Nicola, A.J., Gusev, A.I., Proctor, A., Jackson, E.K., Hercules, D.M., 1995, Application of the fast-evaporating sample preparation method for improving quantification of Angiotensin II by matrix-assisted laser desorption/ionization, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 9:1164.
- Nielen, M.W.F., 1999, MALDI Time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers, *Mass Spectrom Rev.*, 18, 309–344.
- Obert, R. and Dave, B.C., 1999, Enzymatic conversion of carbon dioxide to methanol: enhanced methanol production in silica sol–gel matrices, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 12192–12193.
- Pandey, A., and Mann, M., 2000, Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, 405, 837–846.
- Pandey, P.C. *et al.*, 1996, Reversal in the kinetics of the M-state decay of D96N bacteriorhodopsin: probing of enzyme-catalysed reactions, *Sens. Actuat. B.*, 36, 470–474.
- Park, C. And Clark, D.S., 2002, Sol-Gel Encapsulated Enzyme Arrays for High-Throughput Screening of Biocatalytic Activity, *Biotechnology and Bioengineering* 78, 229–235.
- Pasch, H., Schrepp, W., 2003, MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers, Springer, Berlin, pp. 1–300.
- Pennisi, E., 2003, A low number wins the Gene Sweep Pool, *Science*, 300, 1484.

- Peralta-Perez, M.R., Saucedo-Castaneda, G. and Gutierrez-Rojas, M., 2001, SiO₂ Xerogels: A Suitable Inert Support for Microbial Growth, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 20, 105-110.
- Perera, I.K., Perkins, J., Kantartzoglou, S., 1995, Spin-coated samples for high resolution matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of large proteins, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 9, 180.
- Pierre, A.C., 2004, The Sol-Gel Encapsulation of Enzymes, *Biocatalysis and Biotransformation*, 22, 145-170.
- Pope, E.J.A. *et al.*, 1995, Encapsulation of living tissue cells in an organosilicon, *J. Sol-gel Sci. Technol.*, 55, 33–49.
- Prassas, M. and Hench, L.L., 1984, Ultrastructure Processing of Ceramics, Glasses and Composites; L.L. Hench and D.R. Ulrich (eds.), John Wiley&Sons, New York, pp. 100-125.
- Reetz, M.T. *et al.*, 1997, *In-situ* fixation of lipase-containing hydrophobic sol-gel materials on sintered glass: highly efficient heterogeneous biocatalysts, *Chem. Commun.*, 11, 1397–1398.
- Reetz, M.T. *et al.*, 1996, Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials, *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 527–534.
- Reetz, M.T. *et al.*, 1995, Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 34, 301–303.
- Rodgers, L.E., 2006, The molecular characterization of sol-gel biocatalysts, PhD Thesis, The University New South Wales, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Sydney, Australia.
- Sadasivan, S., Dubey, A.K., Li, Y. and Ramussen, D.H., 1998, Alcoholic Solvent Effect on Silica Synthesis—NMR and DLS Investigation, *J. Sol-Gel Sci. Tech.* 12, 5.

- Sakka, S., 2003, Sol-Gel technology as Reflected in the journal of Sol-gel Science and Tecnology, Journal of Sol-Gel Science and Tecnology, 26, 29-33.
- Salih, B., 2005, Poliamin Kanser İlaçlarının CKII Enzimi ve MYC Onkoproteinler ile Etkileşim Mekanizmalarının Kapiler Elektroforez ve MALDI-MS, ile İncelenmesi, DPT Projesi Sonuç Raporu, Proje No:02 K 020 290-14, Ankara.
- Sglavo, V.M., Carturan, G., Dal Monte, R. and Muraca, M., 1999, SiO₂ Entrapment of animal cells, Journal of Material Science, 34, 3587-3590.
- Shabat, D. *et al.*, 1997, An efficient sol–gel reactor for antibodycatalysed transformations, Chem. Mater., 9, 2258–2260.
- Shen, C.Y. and Kostiç, N.M., 1997, Kinetics of photoinduced electron-transfer reactions within sol-gel silica glass doped with zinc cytochrome c. Study of electrostatic effects in confined liquids, J. Am. Chem. Soc., 119, 1304-1312.
- Shtelzer, S. *et al.*, 1992, Properties of trypsin and of acid phosphatase immobilized in sol–gel glass matrices, Biotechnol. Appl. Biochem., 15, 227-235.
- Takahashi, R., Sato, S., Sodesawa, T., Suzuki, M. and Ogura, K., 2000, Preparation of Microporous Silica Gel by Sol-Gel Process in the Presence of Ethylene Glycol Oligomers, Bull. Chem. Soc. Jpn., 73, 765-774.
- Telefoncu, A., 1997, Enzimoloji., Yüksek Lisans Yazokulu, 21-27 Eylül 1997., Kuşadası, Aydın, Türkiye., 446 s.
- Tischer, W. and Kasche, V., 1999, Immobilized Enzymes: Crystals or Carrier, TIBTECH, Vol 17.
- Tyers, M. and Mann, M., 2003, Genomics to Proteomics, Nature, Vol. 422, 193 - 197.
- Uludağ, Y., 2000, İmmobilize glukomilaz ile maltodekstrinden glukoz üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Tez danışmanı Y.Doç.Dr. Aziz Tanrıseven.

- Wang, B. *et al.*, 1999, Amperometric enzyme electrode for the determination of hydrogen-peroxide-based sol–gel hydrogel composite film, *Anal. Chim. Acta* 407, 111–118.
- Wang, S.S., 1993, *Chemistry of Protein Congutun and Cross Linking*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Weetall, H.H., 1994, D96N mutant bacteriorhodopsin immobilized in sol–gel glass characterization, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49, 241–256.
- Wei, Y., Dong, H., Xu, J. and Feng, Q., 2002, Simultaneous Immobilization of Horseradish Peroxidase and Glucose oxidase in Mesoporous Sol-Gel Host Materials, *Chemphychem* 3, 802-808.
- Weinberger, S.R., Boernsen, K.O., Finchy, J.W., Robertson, V., Musselman, B.D., 1993, An evaluation of crystallization methods for matrix-assisted laser desorption/ionization of proteins, *Proc 41st ASMS Conf Mass Spectrom Allied Topics*, San Francisco, CA. p 775.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Buchmann, A.F. and Kula, M.R., 1981, Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NADH Regeneration, *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 2789–2802.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery - Smith, I., Hochstrasser, D. F. and Williams. K. L., 1995, Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19–50.
- Wollnik, H., 1993, Time-of-flight mass analyzers, *Mass Spectrometry Reviews*, 12:89-114.
- Xi, Y., Liyangying, Z. and Sasa, W., 1995, Poresize and distribution control of porous silica, *Sensors and Actuators B* 24 :347–352.

- Yang, L., 2005, Fabrication and Characterization of Microlasers by the Sol-Gel Method, PhD Thesis, California Institute of Technology Pasadena, California.
- Yener, F., 2007, Pektinaz enziminin farklı iki destek üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez danışmanı Doç.Dr. Güzide Yücebilgiç.
- Zaborsky, O.R., 1973, Immobilized Enzymes, CRC Press, Cleveland, Ohio, p. 175.

EK 1: Bu çalışmada kullanılan biyomoleküllerin aminoasit dizilimleri ve kimyasal formülleri.

PROTEİN	AMİNOASİT DİZİLİMİ	MOLEKÜL AĞIRLIĞI
BSA (Sığır Serum Albumin)	MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIASF SQYLQQCPFDEHVKLVLNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCK VASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPLKLPDPNTLCD EFKADEKKFWGKYLEIARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECQAEDK GACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKF PKAEFVEVTKLVTDLT KVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISS KLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEA DAFLGSFLYEY SRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCA KDDPHACYSTVFDKLHLVDEP QNLKQNC DQFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKV GTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVKCCTESLVN RRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLK HKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTAL A	66400 Da
Sitokrom C	MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTGQAPGFT YTDANKNKGITWKEETLMEYLENPKKYIPGTMIFAGIKKKTEREDLIAYL KKATNE	12400 Da
Ubiquitin	MQIFVKLTGTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLED GRTLSDYNIQKESTLHLVLRLLGG	8565 Da
Tripsin	FIFLALLGA AVFPVDDDDKIVGGYT CGANTVPYQVSLNSGYHFCGGS LI NSQWVVSAAH CYKSGIQVRLGEDNIN VVEGNEQFISASKSIVHPSYNSN TLNNDIMLIKLSAASLNSRVASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTKSSGTS YPDVLKCLKAPILSDSSCKSAYPGQITSNMFCAGYLEGGKDSCQGDSSG PVVCSGKLQGIVSWGSGCAQKNKPGVYTKVCNYSVSWIKQTIASN	25425 Da

EK 2: Bu çalışmada kullanılan proteinlerin teorik peptid parçalanma ürünlerinin listesi.

SIĞIR SERUM ALBUMİN (BSA)

MS-Digest Search Results

(Kütle Spektrometresi-Parçalanma ürünü peptidlerinin araştırılması sonuçları)

Index Number: **1** (İndeks Numarası)

pI of Protein: **5.8** (Proteinin pI değeri)

Protein MW: **69294** (Proteinin Molekül Ağırlığı)

Amino Acid Composition: (Amino asit Bileşimi) **A48 C35 D40 E59 F30 G17 H17 I15 K60 L65 M5 N14 P28 Q20 R26 S32 T34 V38 W3 Y21**

1	MKWVTF ISLL	LLFSSAY SRG	VFRRDTH KSE	IAHRFKD LGE	EHFKGL VLIA	FSQYLQ QCPF	DEHVKL VNEL	TEFAKTC VAD
81	ESHAGCE KSL	HTLFGDE LCK	VASLRET YGD	MADCCE KQEP	ERNECFL SHK	DDSPDLP KLK	PDPNTLC DEF	KADEKKF WGK
16 1	YLYEIAR RHP	YFYAPEL LYY	ANKYNG VFQE	CCQAED KGAC	LLPKIET MRE	KVLASS ARQR	LRCASIQ KFG	ERALKA WSVA
24 1	RLSQKFP KAE	FVEVTKL VTD	LTKVHKE CCH	GDLLECA DDR	ADLAKYI CDN	QDTISSK LKE	CCDKPLL EKS	HCIAEVE KDA
32 1	IPENLPPL TA	DFAEDKD VCK	NYQEAQ DAFL	GSFLYFY SRR	HPEYAV SVLL	RLAKEY EATL	EECCAQ DDPH	ACYSTVF DKL
40 1	KHLVDE PQNL	IKQNCDQ FEK	LGEYGFQ NAL	IVRYTRK VPQ	VSTPTLV EVS	RSLGKV GTRC	CTKPESE RMP	CTEDYLS LIL
48 1	NRLCVL HEKT	PVSEKVT KCC	TESLVNR RPC	FSALTPD ETY	VPKAFD EKLF	TFHADIC TLP	DTEKQIK KQT	ALVELLK HKP
56 1	KATEEQL KTV	MENFVAF VDK	CCAADD KEAC	FAVEGPK LVV	STQTALA			

Num ber	m/z (mi)	m/z (av)	Star t	End	Mis sed Clea vage s	Sequence
1	817.4890	817.9693	452	459	1	(R) SLGKVGTR(C)

1	818.4254	818.9074	562	568	0	(K) <u>ATEEQLK</u> (T)
1	820.4676	820.9726	229	235	1	(K) <u>FGERALK</u> (A)
1	841.4600	842.0542	483	489	0	(R) <u>LCVLHEK</u> (T)
1	847.5036	848.0391	242	248	1	(R) <u>LSQKFPK</u> (A)
1	886.4153	886.9394	131	138	0	(K) <u>DDSPDLPK</u> (L)
1	906.4713	907.0830	205	211	1	(K) <u>IETMREK</u> (V)
1	918.5189	919.1407	221	228	1	(R) <u>LRCASIQK</u> (F)
1	922.4662	923.0823	205	211	1	(K) <u>IETMREK</u> (V)
1	922.4880	923.0600	249	256	0	(K) <u>AEFVEVTK</u> (L)
1	927.4934	928.0823	161	167	0	(K) <u>YLYEIAR</u> (R)
1	960.5473	961.1126	210	218	1	(R) <u>EKVLIASSAR</u> (Q)
1	974.4578	975.0521	37	44	0	(K) <u>DLGEEHFK</u> (G)
1	977.4509	978.1213	123	130	0	(R) <u>NECFLSHK</u> (D)
1	987.5370	988.1411	29	36	1	(K) <u>SEIAHRFK</u> (D)
1	987.5694	988.1414	212	220	1	(K) <u>VLIASSARQR</u> (L)
1	988.5673	989.1637	490	498	1	(K) <u>TPVSEKVTK</u> (C)
1	994.3935	995.0617	413	420	0	(K) <u>QNCDQFEK</u> (L)
1	997.5928	998.2149	549	557	0	(K) <u>QTALVELLK</u> (H)
1	1001.5891	1002.2118	233	241	1	(R) <u>ALKAWSVAR</u> (L)
1	1002.5830	1003.1908	598	607	0	(K) <u>LVVSTQTALA</u> (-)
1	1011.4200	1012.0924	413	420	0	(K) <u>QNCDQFEK</u> (L)
1	1014.6194	1015.2455	549	557	0	(K) <u>QTALVELLK</u> (H)
1	1015.4877	1016.1679	310	318	0	(K) <u>SHCIAEVEK</u> (D)
1	1024.4550	1025.1977	499	507	0	(K) <u>CCTESLVNR</u> (R)
1	1050.4925	1051.2136	588	597	0	(K) <u>EACFAVEGPK</u> (L)
1	1052.4499	1053.2082	460	468	0	(R) <u>CCTKPESER</u> (M)

1	1083.5946	1084.2709	161	168	1	(K) <u>YLYEIARR</u> (H)
1	1138.5674	1139.3265	223	232	1	(R) <u>CASIQKFGER</u> (A)
1	1142.7143	1143.4207	548	557	1	(K) <u>KQTALVELLK</u> (H)
1	1145.6426	1146.3427	236	245	1	(K) <u>AWSVARLSQK</u> (F)
1	1153.6939	1154.4035	257	266	1	(K) <u>LVTDLTKVHK</u> (E)
1	1163.6307	1164.3521	66	75	0	(K) <u>LVNELTEFAK</u> (T)
1	1177.5592	1178.4205	300	309	0	(K) <u>ECCDKP LLEK</u> (S)
1	1193.6022	1194.3001	25	34	1	(R) <u>DTHKSEIAHR</u> (F)
1	1197.5568	1198.3481	337	346	1	(K) <u>DVCKNYQEAK</u> (D)
1	1249.6212	1250.4051	35	44	1	(R) <u>FKDLGEEHFK</u> (G)
1	1283.7106	1284.5100	361	371	0	(R) <u>HPEYAVSVLLR</u> (L)
1	1294.7042	1295.5305	246	256	1	(K) <u>FPKAEFVEVTK</u> (L)
1	1305.7161	1306.5136	402	412	0	(K) <u>HLVDEPQNLIK</u> (Q)
1	1308.7270	1309.5172	558	568	1	(K) <u>HKPKATEEQLK</u> (T)
1	1331.7174	1332.6804	198	209	1	(K) <u>GACLLPKIETMR</u> (E)
1	1347.7123	1348.6798	198	209	1	(K)GACLLPKIETMR(E)
1	1349.5460	1350.4775	76	88	0	(K) <u>TCVADESHAGCEK</u> (S)
1	1352.6661	1353.6120	496	507	1	(K) <u>VTKCCTESLVNR</u> (R)
1	1362.6722	1363.5849	89	100	0	(K) <u>SLHTLFGDELCK</u> (V)
1	1364.4803	1365.5083	106	117	0	(R) <u>ETYGDMADCCEK</u> (Q)
1	1380.4752	1381.5077	106	117	0	(R)ETYGDMADCCEK(Q)
1	1386.6206	1387.5172	286	297	0	(K) <u>YICDNQDTISSK</u> (L)
1	1388.5708	1389.5521	375	386	0	(K) <u>EYEATLEECCA</u> (D)
1	1399.6926	1400.6465	569	580	0	(K) <u>TVMENFVAFVDK</u> (C)
1	1415.6875	1416.6459	569	580	0	(K)TVMENFVAFVDK(C)
1	1418.7382	1419.7561	298	309	1	(K) <u>LKECCDKP LLEK</u> (S)

1	1439.8118	1440.6987	360	371	1	(R) <u>RHPEYAVSVLLR</u> (L)
1	1445.7576	1446.7023	157	167	1	(K) <u>FWGKYLYEIAR</u> (R)
1	1465.6886	1466.6882	456	468	1	(K) <u>VGTRCCTKPESER</u> (M)
1	1479.7954	1480.7173	421	433	0	(K) <u>LGEYGFQNALIVR</u> (Y)
1	1482.7985	1483.7809	483	495	1	(R) <u>LCVLHEKTPVSEK</u> (V)
1	1487.8944	1488.8247	549	561	1	(K) <u>QTALVELLKHKPK</u> (A)
1	1497.6315	1498.6207	387	399	0	(K) <u>DDPHACYSTVFDK</u> (L)
1	1504.9210	1505.8554	549	561	1	(K) <u>QTALVELLKHKPK</u> (A)
1	1511.8428	1512.7570	438	451	0	(K) <u>VPQVSTPTLVEVSR</u> (S)
1	1519.7461	1520.7552	139	151	0	(K) <u>LKPDPNTLCDEFK</u> (A)
1	1546.8952	1547.8493	400	412	1	(K) <u>LKHLVDEPQNLIK</u> (Q)
1	1567.7427	1568.7367	347	359	0	(K) <u>DAFLGSFLYEYSR</u> (R)
1	1578.5981	1579.7368	267	280	0	(K) <u>ECCHGDLLECADDR</u> (A)
1	1595.9268	1596.9250	361	374	1	(R) <u>HPEYAVSVLLRLAK</u> (E)
1	1599.7220	1600.7607	118	130	1	(K) <u>QEPERNECFLSHK</u> (D)
1	1616.7486	1617.7914	118	130	1	(K) <u>QEPERNECFLSHK</u> (D)
1	1627.7996	1628.8528	286	299	1	(K) <u>YICDNQDTISSKLK</u> (E)
1	1633.6621	1634.7944	184	197	0	(K) <u>YNGVFQECCQAEDK</u> (G)
1	1639.9377	1640.9322	437	451	1	(R) <u>KVPQVSTPTLVEVSR</u> (S)
1	1667.8131	1668.9837	469	482	0	(R) <u>MPCTEDYLSLILNR</u> (L)
1	1683.8081	1684.9831	469	482	0	(R) <u>MPCTEDYLSLILNR</u> (L)
1	1692.9418	1693.9902	249	263	1	(K) <u>AEFVEVTKLVTDLTK</u> (V)
1	1700.7870	1701.9671	372	386	1	(R) <u>LAKEYEATLEECCA</u> (D)
1	1723.8438	1724.9253	347	360	1	(K) <u>DAFLGSFLYEYSRR</u> (H)
1	1738.8105	1739.9564	387	401	1	(K) <u>DDPHACYSTVFDK</u> (H)
1	1756.7339	1758.0130	581	597	1	(K) <u>CCAADDKEACFAVEGPK</u> (L)

1	1823.8996	1825.1064	508	523	0	(R) <u>RPCFSALTPDETYVPK</u> (A)
1	1844.8483	1846.0380	123	138	1	(R) <u>NECFLSHKDDSPDLPK</u> (L)
1	1850.8993	1852.1292	529	544	0	(K) <u>LFTFHADICTLPDTEK</u> (Q)
1	1884.9008	1886.1006	281	297	1	(R) <u>ADLAKYICDNQDTISSK</u> (L)
1	1888.9268	1890.1618	169	183	0	(R) <u>HPYFYAPELLYYANK</u> (Y)
1	1888.9949	1890.2254	89	105	1	(K) <u>SLHTLFGDELCKVASLR</u> (E)
1	1890.8030	1892.1488	101	117	1	(K) <u>VASLRETYGDMADCCEK</u> (Q)
1	1897.0753	1898.2236	438	455	1	(K) <u>VPQVSTPTLVEVSRSLGK</u> (V)
1	1900.0076	1901.1889	421	436	1	(K) <u>LGEYGFQNALIVRYTR</u> (K)
1	1906.7980	1908.1482	101	117	1	(K) <u>VASLRETYGDMADCCEK</u> (Q)
1	1942.8204	1944.1874	264	280	1	(K) <u>VHKECCHGDLLECADDR</u> (A)
1	1955.9597	1957.1575	319	336	0	(K) <u>DAIPENLPPLTADFAEDK</u> (D)
1	1962.9477	1964.2151	139	155	1	(K) <u>LKPDPNTLCDEFKADEK</u> (K)
1	2003.1001	2004.3945	3	19	0	(K) <u>WVTFISLLLLFSSAYSR</u> (G)
1	2003.7780	2005.1783	106	122	1	(R) <u>ETYGDMADCCEKQEPER</u> (N)
1	2019.7729	2021.1777	106	122	1	(R) <u>ETYGDMADCCEKQEPER</u> (N)
1	2034.0576	2035.3816	588	607	1	(K) <u>EACFAVEGPKLVVSTQTALA</u> (-)
1	2045.0280	2046.3505	168	183	1	(R) <u>RHPYFYAPELLYYANK</u> (Y)
1	2076.8783	2078.3202	267	285	1	(K) <u>ECCHGDLLECADDRADLAK</u> (Y)
1	2105.9341	2107.4460	569	587	1	(K) <u>TVMENFVAFVDKCCAADDK</u> (E)
1	2121.9290	2123.4453	569	587	1	(K) <u>TVMENFVAFVDKCCAADDK</u> (E)
1	2131.1950	2132.5697	1	19	1	(-) <u>MKWVTFISLLLLFSSAYSR</u> (G)
1	2173.2056	2174.6073	1	19	1	(-) <u>MKWVTFISLLLLFSSAYSR</u> (G)
1	2174.0290	2175.5656	300	318	1	(K) <u>ECCDKPLLEKSHCIAEVEK</u> (D)
1	2199.1002	2200.5312	562	580	1	(K) <u>ATEEQLKTVMENFVAFVDK</u> (C)
1	2215.0951	2216.5305	562	580	1	(K) <u>ATEEQLKTVMENFVAFVDK</u> (C)

1	2220.1369	2221.5964	529	547	1	(K) <u>LFTFHADICTLPDTEKQIK</u> (K)
1	2262.2355	2263.7675	1	19	1	(-) <u>MKWVTFISLLLLFSSAYS</u> R(G)
1	2278.2304	2279.7669	1	19	1	(-)MKWVTFISLLLLFSSAYS(R)(G)
1	2298.1183	2299.5832	402	420	1	(K) <u>HLVDEPQNLIKQNCDQFEK</u> (L)
1	2301.0822	2302.5206	341	359	1	(K) <u>NYQEAKDAFLGSFLYEYS</u> R(R)
1	2304.2461	2305.8051	1	19	1	(-)MKWVTFISLLLLFSSAYS(R)(G)
1	2316.0457	2317.6832	184	204	1	(K) <u>YNGVFQECCQAEDKGACLLPK</u> (I)
1	2320.2410	2321.8044	1	19	1	(-)MKWVTFISLLLLFSSAYS(R)(G)
1	2387.1435	2388.6719	131	151	1	(K) <u>DDSPDLPKLKPDNTLCDEFK</u> (A)
1	2401.1592	2402.6990	319	340	1	(K) <u>DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK</u> (N)
1	2414.1697	2415.7440	508	528	1	(R) <u>RPCFSALTPDETYVPKAFDEK</u> (L)
1	2435.2428	2436.8529	45	65	0	(K) <u>GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK</u> (L)
1	2441.1693	2442.7669	524	544	1	(K) <u>AFDEKLFTFHADICTLPDTEK</u> (Q)
1	2455.1711	2456.7562	413	433	1	(K)QNCDQFEKLGEYGFQNALIVR(Y)
1	2462.3595	2463.9467	3	23	1	(K) <u>WVTFISLLLLFSSAYS</u> RGVFR(R)
1	2472.1976	2473.7869	413	433	1	(K) <u>QNCDQFEKLGEYGFQNALIVR</u> (Y)
1	2490.2553	2492.0151	469	489	1	(R) <u>MPCTEDYLSLILNRLCVLHEK</u> (T)
1	2494.1589	2495.8068	66	88	1	(K) <u>LVNELTEFAKTCVADESHAGCE</u> <u>K</u> (S)

1	2506.2502	2508.0145	469	489	1	(R)MPCTEDYLSLILNRLCVLHEK(T)
1	2693.2004	2695.0397	76	100	1	(K)TCVADESHAGCEKSLHTLFGDE LCK(V)
1	2701.2452	2703.1691	460	482	1	(R) CCTKPESERMPCTEDYLSLILNR(L)
1	2717.2402	2719.1685	460	482	1	(R)CCTKPESERMPCTEDYLSLILNR(L)
1	2829.3368	2831.2813	499	523	1	(K) CCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK (A)
1	2867.1845	2869.1501	375	399	1	(K)EYEATLEECCA KDDPHACYSTV FDK(L)
1	2952.4295	2954.3027	310	336	1	(K)SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADF AEDK(D)

SITOKROM C

MS-Digest Search Results

Index Number: 1

pI of Protein: 9.6

Protein MW: 11833

Amino Acid Composition: A6 C2 D3 E9 F4 G12 H3 I6 K19 L6 M3 N5 P4 Q3 R2
T10 V3 W1 Y4

1	MGDVEK GKKI	FVQKCA QCHT	VEKGGKH KTG	PNLHGLF GRK	TGQAPGF TYT	DANKNK GITW	KEETLME YLE	NPKKYIP GTK
8	MIFAGIK KKT	EREDLIA YLK	KATNE					

Number	m/z (mi)	m/z (av)	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
1	806.4771	806.9862	74	80	1	(K) KYIPGTK(M)
1	846.4832	847.0108	55	61	1	(K) NKGITWK(E)
1	863.4291	864.0142	1	8	1	(-) MGDVEKGG(K)
1	879.4240	880.0135	1	8	1	(-)MGDVEKGG(K)
1	905.4397	906.0517	1	8	1	(-)MGDVEKGG(K)
1	907.5434	908.2012	81	88	1	(K) MIFAGIKK(K)
1	921.4346	922.0511	1	8	1	(-)MGDVEKGG(K)
1	923.5383	924.2006	81	88	1	(K)MIFAGIKK(K)
1	964.5350	965.1412	93	100	0	(R) EDLIAYLK(K)
1	1018.4445	1019.1935	15	23	0	(K) CAQCHTVEK(G)
1	1092.6299	1093.3164	93	101	1	(R) EDLIAYLKK(A)
1	1168.6222	1169.3366	29	39	0	(K) TGPNLHGLFGR(K)
1	1260.5824	1261.4732	15	26	1	(K) CAQCHTVEKGGK(H)
1	1296.7171	1297.5118	29	40	1	(K) TGPNLHGLFGRK(T)

1	1350.7264	1351.5518	90	100	1	(K) <u>TEREDLIAYLK</u> (K)
1	1433.7760	1434.6538	27	39	1	(K) <u>HKTGPNLHGLFGR</u> (K)
1	1438.8127	1439.8144	75	87	1	(K) <u>YIPGTKMIFAGIK</u> (K)
1	1454.8076	1455.8137	75	87	1	(K)YIPGTKMIFAGIK(K)
1	1470.6859	1471.5759	41	54	0	(K) <u>TGQAPGFTYTDANK</u> (N)
1	1495.6985	1496.6864	62	73	0	(K) <u>EETLMEYLENPK</u> (K)
1	1511.6934	1512.6858	62	73	0	(K)EETLMEYLENPK(K)
1	1598.7809	1599.7511	40	54	1	(R) <u>KTGQAPGFTYTDANK</u> (N)
1	1623.7935	1624.8616	62	74	1	(K) <u>EETLMEYLENPKK</u> (Y)
1	1633.8189	1634.9720	10	23	1	(K) <u>IFVQKCAQCHTVEK</u> (G)
1	1639.7884	1640.8609	62	74	1	(K)EETLMEYLENPKK(Y)
1	1712.8238	1713.8555	41	56	1	(K) <u>TGQAPGFTYTDANKNK</u> (G)
1	2081.0260	2082.3948	57	73	1	(K) <u>GITWKEETLMEYLENPK</u> (K)

UBIQUITIN

MS-Digest Search Results

Index Number: 1

pI of Protein: 6.6

Protein MW: 8565

Amino Acid Composition: A2 D5 E6 F2 G6 H1 I7 K7 L9 M1 N2 P3 Q6 R4 S3 T7 V4 Y1

1	MQIFV <u>K</u> TLTG	<u>K</u> TITLEVEPS	DTIENV <u>K</u> AKI	QD <u>K</u> EGIPPDQ	QRLIFAG <u>K</u> QL	EDGR <u>T</u> LSDDYN	IQ <u>K</u> ESTLHLV	LRLRGG

Number	m/z (mi)	m/z (av)	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
1	807.4433	808.0365	1	6	0	(-)MQIFVK(T)
1	823.4382	824.0359	1	6	0	(-)MQIFVK(T)
1	1039.5167	1040.1275	34	42	0	(K) EGIPPDQQR(L)
1	1067.6208	1068.2689	64	72	0	(K) ESTLHLVLR(L)
1	1081.5524	1082.2057	55	63	0	(R) TLDYNIQK(E)
1	1134.6881	1135.4006	1	11	1	(-)MQIFVKTLTGK(T)
1	1176.6987	1177.4381	1	11	1	(-)MQIFVKTLTGK(T)
1	1265.7286	1266.5984	1	11	1	(-)MQIFVKTLTGK(T)
1	1281.7235	1282.5977	1	11	1	(-)MQIFVKTLTGK(T)
1	1307.7392	1308.6359	1	11	1	(-)MQIFVKTLTGK(T)
1	1323.7341	1324.6353	1	11	1	(-)MQIFVKTLTGK(T)
1	1336.8059	1337.6180	64	74	1	(K) ESTLHLVRLR(G)
1	1346.7427	1347.5665	43	54	1	(R) LIFAGKQLEDGR(T)
1	1523.7812	1524.6838	30	42	1	(K) IQDKEGIPPDQQR(L)
1	1668.9068	1669.9330	34	48	1	(K) EGIPPDQQRLIFAGK(Q)

1	1762.8606	1763.9132	49	63	1	(K)QLEDGRTLSDYNIQK(E)
1	1779.8872	1780.9439	49	63	1	(K) <u>QLEDGRTLSDYNIQK</u> (E)
1	1787.9273	1789.0017	12	27	0	(K) <u>TITLEVEPSDTIENVK</u> (A)
1	1987.0594	1988.2562	12	29	1	(K) <u>TITLEVEPSDTIENVKAK</u> (I)
1	2130.1553	2131.4518	55	72	1	(R) <u>TLSDYNIQKESTLHLVLR</u> (L)
1	2288.2231	2289.6011	7	27	1	(K) <u>TLTGKTITLEVEPSDTIENVK</u> (A)

TRIPSIN

MS-Digest Search Results

Index Number: 1

pI of Protein: 8.4

Protein MW: 25785

Amino Acid Composition: **A18 C12 D10 E4 F6 G26 H3 I16 K16 L17 M3 N16 P9 Q10 R2 S34 T11 V19 W4 Y10**

1	MKT <u>F</u> IFL ALL	GA <u>A</u> VAFP VDD	DDK <u>I</u> VGG YTC	GANTVPY QVS	LNSGYHF CGG	SLINSQW VVS	AAHCY <u>K</u> S GIQ	VRLGEDN INV
81	VEGNEQ FISA	S <u>K</u> SIVHPS YN	SNTLNND IML	I <u>K</u> L <u>K</u> SAA SLN	S <u>R</u> VASISL PT	SCASAGT QCL	ISGWGNT <u>K</u> SS	GTSYPDV <u>L</u> KC
161	L <u>K</u> APILS DSS	C <u>K</u> SAYPG QIT	SNMFCA GYLE	GG <u>K</u> DSCQ GDS	GGPVVCS G <u>K</u> L	QGIVSWG SGC	AQ <u>K</u> NKPG VYT	<u>K</u> VCNYVS <u>W</u> IK
241	QT <u>I</u> ASN							

Num ber	m/z (mi)	m/z (av)	Start	End	Mis sed Cle ava ges	Sequence
1	805.416	805.8709	115	122	0	(K) <u>SAASLNSR</u> (V)
1	906.504	907.0636	224	231	0	(K) <u>NKPGVYTK</u> (V)
1	1020.503	1021.184	163	172	0	(K) <u>APILSDSSCK</u> (S)
1	1046.595	1047.206	113	122	1	(K) <u>LKSAASLNSR</u> (V)
1	1111.560	1112.344	232	240	0	(K) <u>VCNYVSWIK</u> (Q)
1	1153.573	1154.269	149	159	0	(K) <u>SSGTSYPDVLK</u> (C)
1	1364.691	1365.663	160	172	1	(K) <u>CLKAPILSDSSCK</u> (S)
1	1433.720	1434.667	210	223	0	(K) <u>LQIVSWGSGCAQK</u> (N)
1	1495.615	1496.624	194	209	0	(K) <u>DSCQGDSGGPVVCSGK</u> (L)
1	1497.761	1498.749	149	162	1	(K) <u>SSGTSYPDVLKCLK</u> (A)

1	1725.862	1727.004	232	246	1	(K) <u>VCNYVSWIKQTIASN</u> (-)
1	1999.047	2000.384	224	240	1	(K) <u>NKPGVYTKVCNYVSWIK</u> (Q)
1	2163.056	2164.347	73	92	0	(R) <u>LGEDNINVVEGNEQFISASK</u> (S)
1	2193.994	2195.493	173	193	0	(K) <u>SAYPGQITSNMFCAGYLEGGK</u> (D)
1	2209.989	2211.492	173	193	0	(K)SAYPGQITSNMFCAGYLEGGK(D)
1	2238.169	2239.589	3	23	0	(K) <u>TFIFLALLGAAVAFPVDDDDK</u> (I)
1	2273.159	2274.617	93	112	0	(K) <u>SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK</u> (L)
1	2289.154	2290.616	93	112	0	(K)SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK(L)
1	2321.207	2322.708	210	231	1	(K) <u>LQGIVSWGSGCAQKNKPGVYTK</u> (V)
1	2366.264	2367.766	1	23	1	(-)MKT <u>FIFLALLGAAVAFPVDDDDK</u> (I)
1	2408.274	2409.802	1	23	1	(-)MKT <u>FIFLALLGAAVAFPVDDDDK</u> (I)
1	2497.304	2498.962	1	23	1	(-) <u>MKT</u> FIFLALLGAAVAFPVDDDDK(I)
1	2513.299	2514.961	1	23	1	(-)MKT <u>FIFLALLGAAVAFPVDDDDK</u> (I)
1	2514.338	2515.952	93	114	1	(K) <u>SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK</u> KLK(S)
1	2530.333	2531.952	93	114	1	(K)SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK(LK(S)
1	2539.315	2540.999	1	23	1	(-)MKT <u>FIFLALLGAAVAFPVDDDDK</u> (I)
1	2552.248	2553.934	123	148	0	(R) <u>VASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTK</u> (S)
1	2555.310	2556.999	1	23	1	(-)MKT <u>FIFLALLGAAVAFPVDDDDK</u> (I)
1	2803.422	2805.092	67	92	1	(K) <u>SGIQVRLGEDNINVVEGNEQFISASK</u> (S)
1	2910.317	2912.268	194	223	1	(K) <u>DSCQGDSGGPVVCSGKLQGIVSWGSG</u> <u>CAQK</u> (N)
1	3195.479	3197.654	163	193	1	(K)

						<u>APILSDSSCKSAYPGQITSNMFCAGYLEGGK(D)</u>
1	3211.474	3213.654	163	193	1	(K)APILSDSSCKSAYPGQITSNMFCAGYLEGGK(D)
1	3338.646	3340.782	115	148	1	(K) <u>SAASLNSRVASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTK(S)</u>
1	3670.591	3673.094	173	209	1	(K) <u>SAYPGQITSNMFCAGYLEGGKDSCQGDSGGPVVCSGK(L)</u>
1	3686.586	3689.094	173	209	1	(K)SAYPGQITSNMFCAGYLEGGKDSCQGDSGGPVVCSGK(L)
1	3686.804	3689.180	123	159	1	(R) <u>VASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTKSSGTSYPDVLK(C)</u>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem DEMİREL

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1983

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1997-2001... Aydınlıkevler Süper Lisesi

Lisans : 2001-2006... Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölüm

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi: DEMETEVLER ONKOLOJİ HASTANESİ-Biyokimya Laboratuvarı,
(2004 Staj)

BAŞKENT BAŞTAŞ ÇİMENTO FABRİKASI, (2005 Staj)