

PEPTİT TÜREVLERİNİN GAZ FAZI REAKSİYON  
MEKANİZMALARININ KÜTLE SPEKTROMETRE İLE  
İNCELENMESİ

**Proje No: 109T436**

**Doç. Dr. Talat Yalçın**

Haziran 2012

İZMİR



## ÖNSÖZ

Tübitak tarafından desteklenen 109T436 nolu “PEPTİT TÜREVLERİNİN GAZ FAZİ REAKSİYON MEKANİZMALARININ KÜTLE SPEKTROMETRE İLE İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışmada, değişik peptit türevleri kullanılarak *b* iyon tipinin makrosiklik oluşumunu ve direk olmayan gaz fazı parçalanma mekanizmalarının amino asit dizilimlerine göre nasıl davrandığı, özellikle asidik, bazik, polar ve non-polar grupların parçalanma mekanizmalarındaki etkileri detaylandırılarak çalışıldı. Bu çalışmalar sırasında, asidik peptitlerin (glutamik asit ve aspartik asit) her ne pozisyonda olursa olsun, makrosiklik yapıda ve direk olmayan parçalanma mekanizmasında her hangi bir etkisi olmadığı gösterildi. Bunun yanında bazik peptitlerden lizin ihtiva eden peptit türevlerinde lizin grubunun yan grubunda bulunan  $\epsilon$ -amin grubunun da direk olmayan parçalanma mekanizmasında ve makrosiklik yapı oluşumunda etkin rol oynadığı gösterildi ve lizin amino asitin peptit içindeki pozisyon etkisi detaylandırıldı. Ayrıca makrosiklik yapı oluşumunda peptit uzunluğu, amino asit pozisyonları, komşu amino asit etkileri ve yan grup etkileri detaylandırılarak çalışıldı. Ayrıca yan grubunda **-OH** bulunan peptit grublarında bu tür peptitlere özgü parçalanma mekanizması detaylandırıldı. Histidin ve arjinin ihtiva eden peptit türevleride çalışılarak makrosiklik yapıya olan etkileri detaylandırıldı.

Proje ekibi, projenin tamamlanmasında emeği geçen yüksek lisans öğrencilerine, desteklerinden dolayı İYTE'ye, maddi ve bilimsel katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür eder.

## KISALTMALAR

FT	Fourier Transformason
ICR	Ion Cyclotron Resonance
MS	Kütle Spektrometre
MS/MS	Ardaşık Kütle Spektrometre
CID	Çarpışma ile Tetiklenen Parçalanma
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TFA	Trifluoro asetik asit
MeOH	Metanol
HCOOH	Formik Asit
A	Alanin
R	Arjinin
N	Asparajin
D	Aspartik Asit
C	Sistein
E	Glutamik Asit
Q	Glutamin
G	Glisin
H	Histidin
I	İzolösin
L	Lösin
K	Lizin
M	Metiyonin
F	Fenilalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Treonin
W	Triptofan
Y	Tirozin
V	Valin
Ac	CH <sub>3</sub> -C=O



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ .....	ii
KISALTMALAR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER.....	10
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
2.1 Kimyasallar ve Örnekler.....	18
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	19
3.1. Asidik Amino Asit İhtiva Eden Peptit Türevleri.....	19
3.1.1. Glutamik veya Aspartik Asit İhtiva Eden Heptapeptit Türevlerinin Makrosiklik Oluşuma Etkileri .....	19
3.1.2 Ardaşık Glutamik veya Aspartik Asit İhtiva Eden Octapeptit Türevlerinin Makrosiklik Oluşumuna Etkileri.....	22
3.2. Sekansında Histidin Amino Asit Grubu Bulunduran Peptit Türevler.....	28
3.3. Sekansında Lizin Amino Asit Grubu Bulunduran Peptit Türevleri.....	34
3.4. Sekansında Hidroksil Grubu İhtiva Eden Peptit Türevleri.....	41
3.4.1. XGGFL-NH <sub>2</sub> Peptit Serisinden Elde Edilen <b>b</b> <sub>5</sub> ve <b>b</b> <sub>4</sub> İyonlarındaki Dipeptit Kopmaları.....	41
4. SONUÇ.....	61

## TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.XGGFL-NH <sub>2</sub> model Peptitlerinden elde edilen <b>b</b> <sub>5</sub> iyonlarında ortak var olan <i>m/z</i> 279 iyonun bağıl şiddetleri ve <b>b</b> <sub>4</sub> iyonlarında ortak var olan <i>m/z</i> 223 iyonunun bağıl şiddetleri.....	43
Tablo 2.AXVYI-NH <sub>2</sub> model peptitlerinden elde edilen <b>b</b> <sub>5</sub> iyonlarında ortak var olan <i>m/z</i> 295 iyonunun bağıl şiddetleri ve <b>b</b> <sub>4</sub> iyonlarında ortak var olan <i>m/z</i> 281 iyonunun bağıl şiddetleri. .....	49

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Protonlanmış peptitlerin direk parçalanma mekanizması.....	10
Şekil 2. Asilyum, $b_2$ -iyonu.....	11
Şekil 3. Okzazolon, $b_2$ iyonu.....	11
Şekil 4. Okzazolon, $b_3$ -iyonu ve $b_4$ -iyonu.....	12
Şekil 5. $b_n$ iyonundan $b_{n-1}$ iyonunun oluşması.....	12
Şekil 6. Değişik isomerlerden elde edilen $b_5$ iyonlarının MS/MS spektrumu.....	15
Şekil 7. $b_5$ iyonunun önerilen yapısı.....	16
Şekil 8. Sekansında glutamik asit bulunan peptit türevlerinden elde edilen $b_7$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumu.....	20
Şekil 9. Sekansında aspartik asit bulunan peptit türevlerinden elde edilen $b_7$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumu.....	21
Şekil 10. Sekansında iki tane glutamik asit bulunan peptit türevlerinden elde edilen $b_8$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumu.....	23
Şekil 11. Sekansında iki tane aspartik asit bulunan peptit türevlerinden elde edilen $b_8$ iyonlarının MS/MS kütle spektrumu.....	24
Şekil 12. AAEEAAAA-NH <sub>2</sub> peptit türevinden elde edilen $b_8$ iyonundan su kopması ve makrosiklik $b_8$ iyon oluşum mekanizmaları.....	25
Şekil 13. Makrosiklik $b_8$ iyonu ve sekiz değişik siklik yapının açılma pozisyonları.....	26
Şekil 14. Tekli ve ikili asidik grup içeren peptit türevlerinin enerjiye bağlı asidik grupların makrosiklik yapıdan kopma profilleri.....	27
Şekil 15. HAAAAAA-NH <sub>2</sub> ve AHAAAAA-NH <sub>2</sub> peptitlerinde izole edilen $b_5$ iyonunun MS <sup>3</sup> kütle spektrumu.....	29
Şekil 16. HAAAAAA-NH <sub>2</sub> , AAAHAAA-NH <sub>2</sub> ve AAAAAAH-NH <sub>2</sub> peptitlerinden izole edilen $b_7$ iyonunun MS <sup>3</sup> kütle spektrumu.....	30
Şekil 17. HAAAAAA-NH <sub>2</sub> , AAAHAAA-NH <sub>2</sub> ve AAAAAAH-NH <sub>2</sub> peptit türevlerinin direk olmayan parçalanma ürünlerinin enerjiye bağlı kopma profilleri.....	31
Şekil 18. HYAGFLV-NH <sub>2</sub> , YAGHFLV-NH <sub>2</sub> ve YAGFLVH-NH <sub>2</sub> peptit türevlerinin direk olmayan parçalanma ürünlerinin enerjiye bağlı kopma profilleri.....	32
Şekil 19. $b_n$ -H (n=4,5,6 ve 7) iyonunun enerjiye bağlı parçalanma profilleri.....	33
Şekil 20. Ac-KYAGFLVG-OH, Ac-QYAGFLV-NH <sub>2</sub> ve Ac-NYAGFLV-NH <sub>2</sub> model peptitlerinden izole edilen $b_7$ iyonunun MS <sup>3</sup> kütle spektrumu.....	35
Şekil 21. Ac-KYAGFLVG-OH peptit türevinden elde edilen $b_7$ makrosiklik iyon oluşum mekanizması.....	36
Şekil 22. Ac-KYAGFLVG peptit türevinden elde edilen $b_7$ makrosiklik iyonunun siklik yapının açılma mekanizması.....	37
Şekil 23. Ac-K(Ac)YAGFLVG model peptitinden izole edilen $b_7$ iyonunun MS <sup>3</sup> kütle spektrumu.....	38
Şekil 24. Ac-KYAGFLVG-OH, Ac-QYAGFLV-NH <sub>2</sub> , Ac-NYAGFLV-NH <sub>2</sub> peptitlerin $b_7$ iyonlarından elde edilen $m/z$ 651 iyonun ve YAGFLV-NH <sub>2</sub> peptitinden elde edilen $b_6$ ( $m/z$ 651) iyonun kütle spektumunun karşılaştırılması .....	39
Şekil 25. Ac-KYAGFLVG-OH, Ac-YKAGFLVG-OH, Ac-YAKGFLVG-OH, Ac-YAGKFLVG-OH, Ac-YAGFKLVG-OH ve Ac-YAGFLKVG-OH peptit türevlerinden izole edilen $b_7$ iyonların kütle spektumunun karşılaştırılması .....	40
Şekil 26. (a) SGGFL-NH <sub>2</sub> model peptitinden izole edilen $b_5$ iyonunun MS <sup>3</sup> kütle spektrumu, (b) $b_5$ iyonunun parçalanması sonucunda oluşan $m/z$ 279 iyonunun MS <sup>4</sup> kütle spektrumu, (c) FL-OH dipeptitinin [M+H] <sup>+</sup> MS <sup>2</sup> kütle spektrumu.....	42
Şekil 27. (a) EGGFL-NH <sub>2</sub> model peptitinden izole edilen $b_4$ iyonunun MS <sup>3</sup> kütle spektrumu, (b) $b_4$ iyonunun parçalanması sonucunda oluşan $m/z$ 223 iyonunun MS <sup>4</sup> kütle spektrumu, (c) GF-OH dipeptitinin [M+H] <sup>+</sup> MS <sup>2</sup> kütle spektrumu.....	44
Şekil 28. XGGFL-NH <sub>2</sub> (X: T, E, D ve Y) peptit serisinden elde edilen $b_5$ iyonlarının parçalanması sonucunda oluşan $m/z$ 279 iyonlarının MS <sup>4</sup> CID kütle spektrumları.....	45
Şekil 29. XGGFL-NH <sub>2</sub> (X: S, T ve D) peptit serisinden elde edilen $b_4$ iyonlarının parçalanması sonucunda oluşan $m/z$ 223 iyonlarının MS <sup>4</sup> CID kütle spektrumları.....	46
Şekil 30. LF-OH ve FG-OH dipeptitlerinin [M+H] <sup>+</sup> MS/MS kütle spektrumları.....	47
Şekil 31. (a) ASVYI-NH <sub>2</sub> model peptitinden izole edilen $b_5$ iyonunun MS <sup>3</sup> kütle spektrumu, (b) $b_5$ iyonunun parçalanması sonucunda oluşan $m/z$ 295 iyonunun MS <sup>4</sup> kütle spektrumu, (c) YI-OH dipeptitinin [M+H] <sup>+</sup> MS <sup>2</sup> kütle spektrumu.....	48

Şekil 32. AXVYI-NH <sub>2</sub> (X: T, E, D ve Y) peptit serisinden elde edilen <b>b</b> <sub>5</sub> iyonlarının parçalanması sonucunda oluşan <i>m/z</i> 295 iyonlarının MS <sup>4</sup> CID kütle spektrumları.....	49
Şekil 33. ATVYI-NH <sub>2</sub> model peptitinden izole edilen <b>b</b> <sub>5</sub> iyonunun MS <sup>3</sup> kütle spektrumu, (b) <b>b</b> <sub>4</sub> iyonunun parçalanması sonucunda oluşan <i>m/z</i> 281 iyonunun MS <sup>4</sup> kütle spektrumu, (c) VY-OH dipeptitinin [M+H] <sup>+</sup> MS <sup>2</sup> kütle spektrumu.....	50
Şekil 34. AXVYI-NH <sub>2</sub> (X: S, E ve D) peptit serisinden elde edilen <b>b</b> <sub>4</sub> iyonlarının parçalanması sonucunda oluşan <i>m/z</i> 281 iyonlarının MS <sup>4</sup> CID kütle spektrumları.....	51
Şekil 35. IY-OH ve YV-OH dipeptitlerinin [M+H] <sup>+</sup> MS/MS kütle spektrumları.....	52
Şekil 36. Değişik peptit türevlerinden elde edilen <b>b</b> <sub>6</sub> iyonlarının MS/MS kütle spektrumları. ....	54
Şekil 37. Değişik peptit türevlerinden elde edilen <b>b</b> <sub>6</sub> iyonlarının iyon şiddetlerinin enerjiye bağlı grafiksel değişim profilleri.....	55
Şekil 38. Değişik peptit türevlerinden elde edilen <b>b</b> <sub>6</sub> iyonlarının MS/MS Kütle spektrumu.....	56
Şekil 39. Değişik peptit türevlerinden elde edilen <b>b</b> <sub>6</sub> iyonlarının iyon şiddetlerinin enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları.....	56
Şekil 40. Değişik peptit türevlerinden elde edilen <b>b</b> iyonlarından asidik amino asit grubunun kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları.....	57
Şekil 41. Değişik peptit türevlerinden elde edilen <b>b</b> iyonlarından bazik amino asit gruplarının kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları.....	57
Şekil 42. Değişik peptit türevlerinden elde edilen <b>b</b> iyonlarından polar olamayan grupları bulunan amino asitlerin kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları.....	58
Şekil 43. Değişik peptit türevlerinden elde edilen <b>b</b> iyonlarından polar grupları bulunan amino asitlerin kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları.....	59
Şekil 44. Arginin ihtiva eden model peptitlerinden izole edilen <b>b</b> <sub>6</sub> iyonunun MS <sup>4</sup> kütle spektrumu .....	60

## ÖZET

Proteinlerin aminoasit dizilimleri, ardaşık kütle spektrometresi (MS/MS) kullanılarak bulunmaktadır. Amino asit dizilimi bulunmak istenen proteinler, önce enzim yardımı ile küçük peptit gruplarına parçalanmakta ve daha sonra, bu peptitlerin, amino asit dizilimleri ardaşık kütle spektrometre kullanılarak bulunabilmektedir. Günümüzde, ardaşık kütle spektrometre kullanarak bu tür peptitlerin gaz fazında ne tür parçalanma ürünleri verdiği konusunda çok detaylı çalışmalar yapılmış ve hâlâda yapılmaktadır. Peptitelerin, gaz fazı parçalanma mekanizmalarının çok iyi anlaşılması, proteinlerin sekanslarının doğru ve etkin bir şekilde bulunabilmesi için çok önemlidir. Bu konuda yapılan detaylı çalışmalar göstermektedir ki, amino asitlerin gruplanmalarını ve isimlendirmelerini belirleyen fonksiyonel grupların, peptitlerin gaz fazı parçalanma mekanizmalarında önemli rol oynadığıdır.

Bu çalışmada, değişik peptit türevleri kullanılarak son yıllarda gözlemlenen **b** iyon tipi olan makrosiklik oluşumun ve direk olmayan gaz fazı parçalanma mekanizmalarının amino asit dizilimlerine göre nasıl davrandığı, özellikle asidik, bazik, polar ve non-polar grupların parçalanma mekanizmalarındaki etkileri detaylandırılarak çalışıldı. Bu çalışmalar sırasında, asidik peptitlerin (glutamik asit ve aspartik asit) yan gruplarının ve pozisyonlarının makrosiklik yapıda ve direk olmayan parçalanma mekanizmasında her hangi bir etkisi olmadığı gösterildi. Bunun yanında bazik peptitlerden lizin ihtiva eden peptit türevlerinde lizin grubunun yan bağında bulunan  $\epsilon$ -amin grubunun direk olmayan parçalanma mekanizmasında ve makrosiklik yapı oluşumunda etkin rol oynadığı gösterildi ve lizin amino asitin pozisyonunun önemli olduğu gösterildi. Ayrıca makrosiklik yapı oluşumunda peptit uzunluğu, amino asit pozisyonları, komşu amino asit etkileri ve yan grup etkileri detaylandırılarak çalışıldı. Ayrıca, yan grubunda **-OH** bulunan peptit gruplarında bu tür peptitlere özgü parçalanma mekanizması detaylandırıldı. Histidin ve arjinin ihtiva eden peptit türevleride çalışılarak makrosiklik yapıya etkileri detaylandırıldı.

*Anahtar kelimeler:* amino asit, peptit türevleri, parçalanma mekanizmaları, lizine  $\epsilon$ -amin yan grubu, makrosiklik yapı, peptit uzunluğu, yan grup, pozisyon, komşu amino asit, glutamik asit, aspartik asit, polar ve non-polar gruplar, bazik ve asidik amino asitler





## ABSTRACT

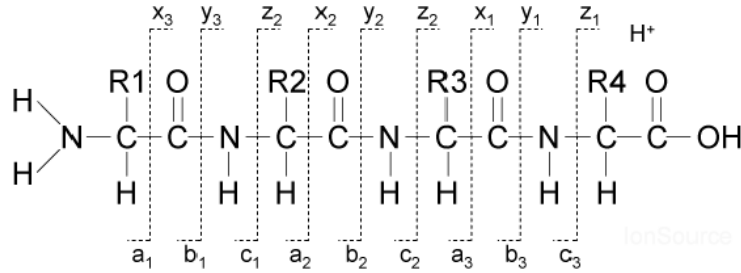
Amino acids sequence of proteins can be determined by using tandem mass spectrometry. In order to find the amino acid sequence of the proteins, first, proteins should be digested with enzyme to obtain small peptides and then the sequences of these peptides should be determined by using tandem mass spectrometry. Gas phase reaction mechanism of peptides has been studied in details by using tandem mass spectrometry. There are several group are still working on this subject. It is important to understand the fragmentation reaction mechanism of peptides well to obtain the sequence of protein correctly. The details studies of peptide fragmentation mechanism showed that, the functional group that is used to groups and name the amino acids, is played important role in the fragmentation reaction mechanism of peptides.

In this study, peptides derivatives were used to investigate the gas phase reaction mechanism in details. Different length of peptides and the functional group of the amino acid such as acidic, basic, polar and non-polar and orientation of those amino acids were studied in details to obtain their effect on the non-direct gas phase reaction mechanism as well as the macrocyclic formation of *b* type ions. It was observed that, acidic peptides (glutamic acid and aspartic acid) did not affect the amcrocyclization. It is clearly shown that the side chain of the acidic residues as well as the position, do not affect the sequence scrambling of the *b* ions. In addition, it was shown that *ε-amine* group of lysine derivative peptides, did play important role for the macrocyclization formation. It was also observed that, the position of the lysine amino acid is important for the macrocyclization. Peptides size, position of amino acid, the affect of neighbor amino acid and side chain effect were studied in details as well. The peptides containing *-OH* group in their side chain were also studied in details and their reaction mechanism were proposed. Histidine and arginine containing peptide derivatives were also studied in details.

*Keywords:* amino acid, peptides, fragmentation mechanism, lysine *ε-amine* side chain, macrocyclic structure, peptide size, side chain, position, neighbor amino acid, glutamik acid, aspartic acid, polar and non-polar group, basic and acidic amino acids

## 1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

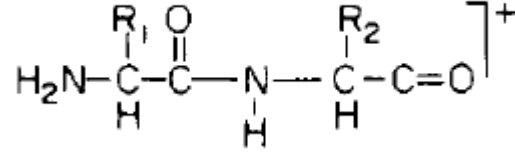
Bilindiği üzere proteinler 20 temel amino asitten oluşmaktadır. Bu amino asitler, kendi aralarında asidik, bazik, polar ya da non-polar olarak sınıflandırılmışlardır. Kütle spektrometresi, peptitlerin ve proteinlerin sekanslarının doğru bir şekilde bulunmasına yardımcı olan önemli bir araçtır. Proteinlerin, amino asit dizimlerinin doğru bir şekilde bulunması, yapılan çalışmanın özgün bir şekilde sonuçlanabilmesi açısından çok önemlidir. Genel olarak, protein data bankası taramalarında, proteinlerin amino asit dizilimlerinden enzim yolu ile kopartılan peptitlerin sekansları (amino asit dizilimleri), ardışık kütle spektrometresi yöntemi ile bulunmaya çalışılmaktadır. Peptitlerdeki amino asit dizilimlerinin doğru olarak tanımlanabilmesi, proteinin amino asit dizilimini doğru olarak bulmak için en önemli basamaktır. Peptitlerin gaz fazı parçalanma ürünleri Şekil 1’de gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, amino asit bağları kopduğunda, eğer pozitif yük amin tarafında kalırsa (*N-terminal*) kalırsa *a*, *b* ve *c* iyonları oluşmakta, pozitif yük karboksilik asit (*C-terminal*) tarafında kalırsa *x*, *y* ve *z* iyonları oluşmaktadır. Bunlara ek olarak *v*, *w*, ve *d* olarak adlandırılan iyon türleride görülebilmektedir. Bu isimlendirme Roepstorff and Fohlman (ROEPSTORFF,1984) tarafından literatüre kazandırılmış ve daha sonra Biemann ve arkadaşları (JOHNSON,1988; BIEMANN,1990) tarafından modifiye edilmiştir. Günümüzde de bu modifiye edilmiş şekli kabul görmüştür.



Şekil 1. Protonlanmış peptitlerin direk parçalanma mekanizması

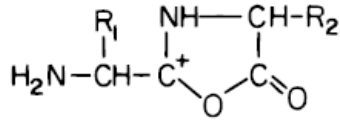
Peptitlerin gaz fazı parçalanma çalışmaları ve oluşan iyonların parçalanma mekanizmaları, kabul gören bu sisteme göre yapılmıştır. Bu bağların kopması sırasında oluşan *b*-iyonları ve/veya *y*-iyonları, peptitlerin kütle spektrumlarında en fazla gözlemlenen iyon türleri olmuşlardır. Bu iyonlar, peptitlerin amino asit dizilimlerine veya kullanılan gaz fazı parçalanma şekline göre değişimler gösterebilmektedirler. 1995 yılına kadar *b*-iyonunun

gaz fazındaki olası yapısı Şekil 2. de gösterildiği gibi asilyum iyonu olarak kabul edilmiştir ve yapılan bütün gaz fazı parçalanma mekanizması çalışmaları bu yapı göz önüne alınarak açıklanmaya çalışılmıştır.



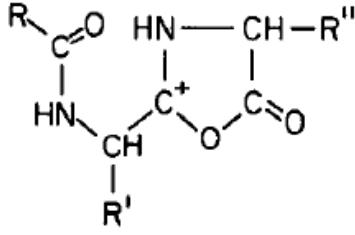
Şekil 2. Asilyum,  $b_2$ -iyonu

1995 yılında Yalçın ve arkadaşları (YALCIN,1995) detaylı bir çalışma sonucunda  $b_2$  iyonun gaz fazı yapısının, kabul edildiği gibi asilyum iyonu değil, Şekil 3’de gösterildiği gibi okzazolon diye isimlendirilen siklik bir yapıya sahip olduğunu göstermişlerdir.



Şekil 3. Okzazolon,  $b_2$  iyonu [YALCIN 1995]

Önerilen  $b_2$  iyonun yapısının ardından, büyük zincirli peptit türevlerinde, her zaman gözlenen  $b_3$ ,  $b_4$  gibi iyonlarının gaz fazı yapısının ne olabileceği sorusu gündeme gelmiş ve Yalçın ve arkadaşları (YALCIN,1996) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda bu iyonlarının Şekil 4’de gösterildiği gibi siklik okzazolon yapısına sahip olduğu deneysel ve teorik çalışmalar ile açıklanmıştır.

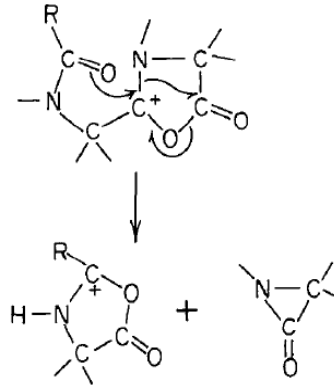


$b_3$ -iyonu

$b_4$ -iyonu

Şekil 4. Okazolon,  $b_3$ -iyonu ve  $b_4$ -iyonu [YALCIN 1996]

Önerilen bu yapı sayesinde daha önceleri açıklanamayan bir çok sonuç açıklanabilmiştir. Mesela,  $b_n$  iyonunun bir alt,  $b_{n-1}$  iyonuna nasıl parçalandığı açıklanabilmiştir. Yalcin ve arkadaşları (YALCIN,1996) tarafından önerilen mekanizma Şekil 5’de gösterilmiştir.



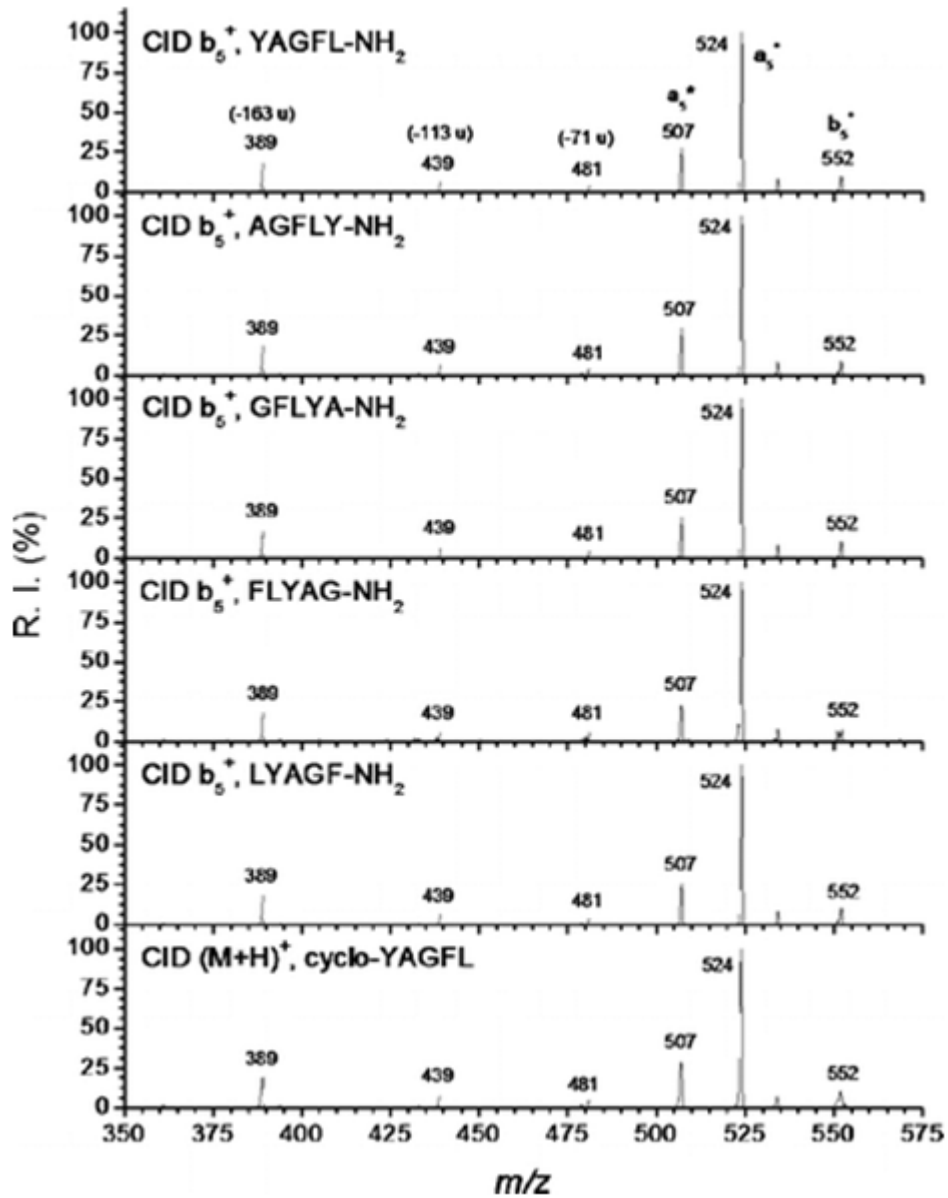
Şekil 5.  $b_n$  iyonundan  $b_{n-1}$  iyonunun oluşması [YALCIN 1996]

Bu çalışmalar sonucunda peptitlerin gaz fazı parçalanma çalışmaları daha detaylı ve hızlı bir şekilde bir çok grup tarafından çalışılmaya başlanmıştır. Paizs ve arkadaşları (PAIZS,1999) değişik peptit türevleri kullanılarak, gaz fazı parçalanma mekanizmaları çalışmış ve oluşan  $b_2$  iyonlarının okazolon yapısına sahip olduğu göstermişlerdir. Farrugia ve arkadaşları (FARRUGIA,2001) peptit türevlerinde, eğer amino asit diziliminin ikinci sırasında, proline bulunuyorsa, oluşan  $b_2$  iyonunun yapısının oxazolone olmadığını

bildirmişlerdir. Diziliminde prolin bulunan ikili peptit türevlerinden oluşan  $b_2$  iyonlarının yapısının, diketopeparazin olduğu bildirilmiştir (SMITH,2005). Bu çalışma göstermektedir ki, amino asit dizilimleri, oluşan iyonun yapısını da etkilemektedir. Padron ve arkadaşları (GONZALES,1996) bazik amino asitlerin peptit türevlerindeki amino asit dizilimindeki pozisyonuna göre, *C-terminal* pozisyonundaki amino asit grubunu etkilediğini ve bunun sonucunda bu amino asitlerin gaz fazında yer değiştirme reaksiyonu gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu yer değiştirme reaksiyonları, gaz fazında çok sık gözlemlenmeyen bir olaydır ve bu mekanizmanın bilinmesi, analizi yapılan peptit türevlerinin bazik amino asit gruplarını ihtiva edip etmediği bilgisini sağlamaktadır. Gaskel ve arkadaşları (COX,1996) ise, yüksek bazik özelliğine sahip amino asitlerin, eğer, N-terminus pozisyonunda bulunması durumunda, peptit türevlerinin ardaşık kütle sinyallerinde baskın olarak *b*-türü iyonlar oluşturduğunu, eğer *C-terminal* pozisyonunda bulunuyorlarsa ise, baskın olarak *y*-türü iyonların daha fazla gözlemleneceğini rapor etmişlerdir. Glish ve arkadaşları (VACHET,1997), ardaşık kütle spektrometre sistemi ile yaptıkları deneylerin sonucunda iyonların kullanılan kütle spektrometre türlerine bağlı olarak, eğer gaz fazı parçalanma süreleri, uzun tutulursa, peptit zincirinde bulunan amino asitlerin, kendi içlerinde yer değiştirdiklerini ve bunun sonucunda da hiç beklenmeyen parçalanma ürünleri gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, sözkonusu özgün parçalanma mekanizması, sadece iyon tuzağı (ion trap), üçlü dört uçlu (triple quadrupole), FT-ICR-MS ve tuzak özellikli üçlü dört uçlu (q-trap) sistemlerde gözlemlenirken, sektör tipi kütle spektrometresinde görünmemesi ilgi çekicidir. Bu gözlemlerde göstermektedir ki, peptitlerin gaz fazı parçalanma mekanizmaları kullanılan kütle spektrometre türüne göre bazı farklılıklar gösterebilmektedir. Günümüzde, modern kütle spektrometre sistemleri, değişik teknik özelliklere sahip olması nedeniyle gaz fazı parçalanma mekanizmalarında sisteme özel olma olasılığını gündeme getirmiştir. Ayrıca, analizi yapılan peptit türevlerine iyonlaşma sırasında takılan hareketli protonların peptitlerin gaz fazı parçalanma mekanizmalarını nasıl etkilediği detaylı olarak Wysocki ve arkadaşları (WYSOCKI,2000) tarafından detaylı olarak çalışılmış ve sonuç olarak, eğer takılan proton asidik amino asit üzerinde bulunmuyorsa gaz fazı parçalanma çalışmalarında bu asidik amino asit bağının koptuğunu, ama, eğer proton takılan amino asit histidine üzerinde bulunuyorsa bu amino asitin bağının koptuğunu gözlemişlerdir. Yüksek bazik özelliği olan arjinin amino asit grubu ile birlikte asidik amino asitleri bünyesinde bulunduran peptit türevlerinde özel olarak bu asidik amino asit bağlarının koptuğu gözlemlenmiştir (TSAPRAILIS,2000). Proteinlerden,

enzim yardımı ile kopan ve amino asit dizilimi bilinmeyen peptitlerin sekansları da günümüze kadar bu mekanizmalar göz önünde bulundurularak tanımlanmaya çalışılmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, peptitlerin bazı durumlarda karmaşık parçalanma mekanizmaları da sergilediğini göstermiştir. 2008 yılında Harrison ve arkadaşları (BLEIHOLDER,2008; HARRISON, 2008) peptitlerin karmaşık parçalanma mekanizmaları konusunda model peptitler ve dört uçlu-uçuş zamanlı (q-TOF) sistemi kullanarak detaylı bir çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmada altı adet birbirinin isomeri olan peptit türevleri kullanılmış ve bu peptitlerin her birinden elde edilen  $b_5$  iyonlarının ardaşık kütle spektrometre sonuçları karşılaştırılmıştır. Peptit türevlerindeki amino asitler aynı olduğu halde, dizilimleri farklı olduğundan dolayı peptitlerin bilinen gaz fazı parçalanma mekanizmalarına göre farklı kütle spektrumu gözlenmesi beklenirken, ilginç bir şekilde bütün  $b_5$  iyonlarının aynı kütle spektrumunu gösterdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen kütle spektrumu Şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 6. Değişik isomerlerden elde edilen  $b_5$  iyonlarının MS/MS spektrumu  
[BLEIHOLDER,2008]

Bu bağlamda, bugüne kadar bilinen direk parçalanma mekanizmalarının yanısıra, kütle spektrometrelerin teknik özelliklerine (analizör ve parçalanma türü) bağlı olarak, birbirlerinin isomeri olan peptit türevlerinin, değişik kütle sistemlerinde gaz fazı parçalanma mekanizmalarının farklılık gösterebileceği açıklanmıştır. Bu çalışmada, oluşan  $b_5$  iyonun oxazolone yapısından, gaz fazında, zaman içerisinde, Şekil 7'de gösterildiği bir yapıya dönüştüğü rapor edilmiştir. Sonuçta  $b$ -iyonunun gaz fazında kendi içerisinde daha büyük bir siklik bir yapıya dönüştüğü gözlemlenmiştir. Bu yapı oluştuğu için de, şekilde de gösterildiği

gibi, her bağın, kopma dereceleri, yakın olduğundan dolayı, hangi isomer olursa olsun, sonuçta, oluşan bu siklik yapının parçalanma ürünleri aynı olmaktadır ve bundan dolayı da peptit isomerlerinden elde edilen ve  $b_5$  iyonunun parçalanma ürünleri benzer olabilmektedir.

Şekil 7.  $b_5$  iyonunun önerilen yapısı [BLEIHOLDER,2008; HARRISON, 2008]

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (BYTHELL, 2010) histidin amino asidi ihtiva eden peptit türevlerinde  $b$  iyon türü makrosiklik yapı oluşumunda bu amino asidin pozisyonun önemli olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise arjinin ihtiva eden peptit türevlerinin bu gruptan dolayı, pozisyonu ne olursa olsun hiç bir şekilde makrosiklik yapı oluşturmadığını göstermişlerdir (MOLESWORTH,2010). Başka bir grup ise amino asit yan grubunun makrosiklik yapının belli bölgelerden bağ kırılma etkilerini detaylandırmıştır (MOLESWORTH, 2010).

Bu projede, değişik peptit türevleri kullanılarak son yıllarda gözlemlenen  $b$  iyon tipi olan makrosiklik oluşumun ve direk olmayan gaz fazı parçalanma mekanizmalarının amino asit dizilimlerine göre nasıl davrandığı, özellikle asidik, bazik, polar ve non-polar grupların parçalanma mekanizmalarındaki etkileri detaylandırılarak çalışıldı. Bu çalışmalar sırasında, asidik peptitlerin (glutamik asit ve aspartik asit) yan gruplarının ve pozisyonlarının makrosiklik yapıda ve direk olmayan parçalanma mekanizmasında her hangi bir etkisi olmadığı gösterildi. Bunun yanında bazik peptitlerden lizin ihtiva eden peptit türevlerinde lizin grubunun yan bağında bulunan  $\epsilon$ -amin grubunun direk olmayan parçalanma mekanizmasında ve makrosiklik yapı oluşumunda etkin rol oynadığı gösterildi ve lizin amino asitin pozisyonun önemli olduğu belirtildi. Ayrıca makrosiklik yapı oluşumunda peptit uzunluğu, amino asit pozisyonları, komşu amino asit etkileri ve yan grup etkileri detaylandırılarak çalışıldı. Ayrıca, yan grubunda  $-OH$  bulunan peptit gruplarında bu tür



peptitlere özgü parçalanma mekanizması detaylandırıldı. Histidin ve arjinin ihtiva eden peptit türevleride çalışılarak makrosiklik yapıya olan etkileri detaylandırıldı.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmalar sırasında LTQ XL Linear İyon Tuzaklamalı Trap (Thermo Finnigan, San Jose, CA), hibrid üçlü quarupole/linear iyon tuzaklamalı (4000 Q-Trap, Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada), MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik Ultra Flex III, USA) sistemleri kullanılmıştır. Düşük düşük enerjili CID deneyleri için üçlü quadrupole/düzlemsel iyon tuzaklamalı 4000 Q-TRAP sistem kullanılmıştır. İyon tuzaklamalı ve quadrupole sistemlerinde örnekleri iyonlaştırmak için elektrospray iyonlaştırma tekniği kullanılmıştır. TOF/TOF sisteminde ise örnekleri iyonlaştırmak için lazer tekniği kullanılmıştır. Peptit örnekleri, iyon tuzaklamalı ve quadrupole sistemlerine şırınga pompası yardımı ile ve akış hızı 5 uL/dk olacak şekilde verilmiştir. Püskürtme gazı, solvent uzaklaştırma gazı ve CID gazı olarak azot gazı kullanılmıştır. Deneyler sırasında, sistemin bütün parametreleri her bir örnek için en yüksek ve kararlı sinyal elde edene kadar her defasında ayarlanmıştır. *b* iyonu parçalanma çalışmaları için MS/MS modu kullanılmıştır. Bu çalışma için, iyon sprey voltajı +5500 V olarak ayarlanmıştır. MALDI-TOF/TOF sisteminde ise target üstüne örnekler konulmaktadır. Bu teknikte, matriks ile karıştırılan örnek MALDI targetin üstüne 1 uL olarak uygulanmakta ve daha sonra çözücü uçurulmakta ve yeniden bir kristal bir yapı oluşturulmaktadır. İyonlaştırma ise oluşan bu kristal üstüne gönderilen lazer ve matriks yardımı ile sağlanmaktadır. Target yüzeyine uygulanan matriks-örnek karışımının üzerine gönderilen lazer ışığı sayesinde matriks gelen enerjiyi emmekte ve yüzeyden buharlaşmaya ve iyonlaşmaya başlamaktadır. Bu arada matriksler tarafından sarılmış olan örnekler de bu sayede gaz fazına geçmekte ve geçiş sırasındaki çarpışmalar anında çevreden yüksüz örneklere proton transferleri oluşabilmektedir. Bu sayede yüksüz örnekler yüklü iyonlara dönüştürülmekte ve kütle spektrometre ile analizleri yapılabilmektedir. Bu teknikte örnekler katı ortamdan gaz ortamına geçirilmektedir. Bu tekniğin aksine elektrospray tekniğinde ise, örnekler sıvı ortamdan gaz fazına geçirilmektedir. Bu teknikte, şırınga ucuna uygulanan +5500 voltaj uygulanan voltajın polaritesine bağlı olarak artı veya eksi yüklü iyonları oluşturmaktadır.

## 2.1. Kimyasallar ve örnekler

Bu çalışmada kullanılan model peptit örnekleri, GLO Biochem Ltd. (Shangai, China) firmasına sentezlettirilmiştir. Asidik amino asit ihtiva eden örnekler ile yapılan çalışmada, XAAAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AXAAAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAXAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAXAAA-NH<sub>2</sub>, AAAAXAA-NH<sub>2</sub>, AAAAAXA-NH<sub>2</sub>, AAAAAAX-NH<sub>2</sub>, XXAAAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAXXAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAAXXAA-NH<sub>2</sub>, AAAAAAXX-NH<sub>2</sub> (X= E veya D) peptit türevleri kullanılmıştır. Lizin ile ilgili çalışmada, Ac-KYAGFLVG-OH, Ac-QYAGFLV-NH<sub>2</sub>, Ac-NYAGFLV-NH<sub>2</sub>, Ac-YKAGFLVG-OH, Ac-YAKGFLVG-OH, Ac-YAGKFLVG-OH, Ac-YAGFKLVG-OH ve Ac-YAGFLKVG-OH peptit türevleri kullanılmıştır. Peptit büyüklüğü, amino asitlerin pozisyonlarının, foksiyonel gruplarının ve komşularının etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise, YAGFLV-NH<sub>2</sub>, AGFLVY-NH<sub>2</sub>, GFLVYA-NH<sub>2</sub>, FLVYAG-NH<sub>2</sub>, LVYAGF-NH<sub>2</sub>, VYAGFL-NH<sub>2</sub>, FAYVGL-NH<sub>2</sub>, GVIYALF-NH<sub>2</sub>, VFYLAG-NH<sub>2</sub>, XYAGFLV-NH<sub>2</sub> and YAGXFLV-NH<sub>2</sub> (X = C, D, E, H, K, M, N, P, Q, S, T, ve W amino asitler). Yan gruplarında hidroksil bulunduran örnekler ile ilgili yapılan çalışmada, XGGFL-NH<sub>2</sub> ve AXVYI-NH<sub>2</sub> (X = S, T, E, D, Y) peptit türevleri kullanıldı. Bunlara ek olarak FL-OH, GF-OH, YI-OH, and VY-OH peptit türevleri kullanıldı. Bazik amino asitler ile yapılan çalışmada, HAAAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AHAAAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAHAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAHAAA-NH<sub>2</sub>, AAAAHAA-NH<sub>2</sub>, AAAAAHA-NH<sub>2</sub>, AAAAAAH-NH<sub>2</sub> peptit türevleri ile HYAGFLV-NH<sub>2</sub>, YAGHFLV-NH<sub>2</sub> ve YAGFLVH-NH<sub>2</sub> peptit türevleri ile çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca, RYAGFLV-NH<sub>2</sub>, YRAGFLV-NH<sub>2</sub>, YARGFLV-NH<sub>2</sub>, YAGRFLV-NH<sub>2</sub>, YAGFRLV-NH<sub>2</sub>, YAGFLRV-NH<sub>2</sub>, YAGFLVR-NH<sub>2</sub>, RAAAAAAAA-NH<sub>2</sub>, ARAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AARAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAARAAA-NH<sub>2</sub>, AAAARAA-NH<sub>2</sub>, AAAAARA-NH<sub>2</sub>, ve AAAAAAR-NH<sub>2</sub> peptit türevleri ile çalışmalar detaylandırılmıştır. HPLC kalitesindeki metanol, formik asid, TFA, asetonitril ve deneyler sırasında kullanılan çözücüler Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır.

100 µM peptit çözeltileri 50:50:1 (v/v/v) MeOH/H<sub>2</sub>O/HCOOH çözücü karışımı ile hazırlanmış ve elektrospray deneyleri için kullanılmıştır.

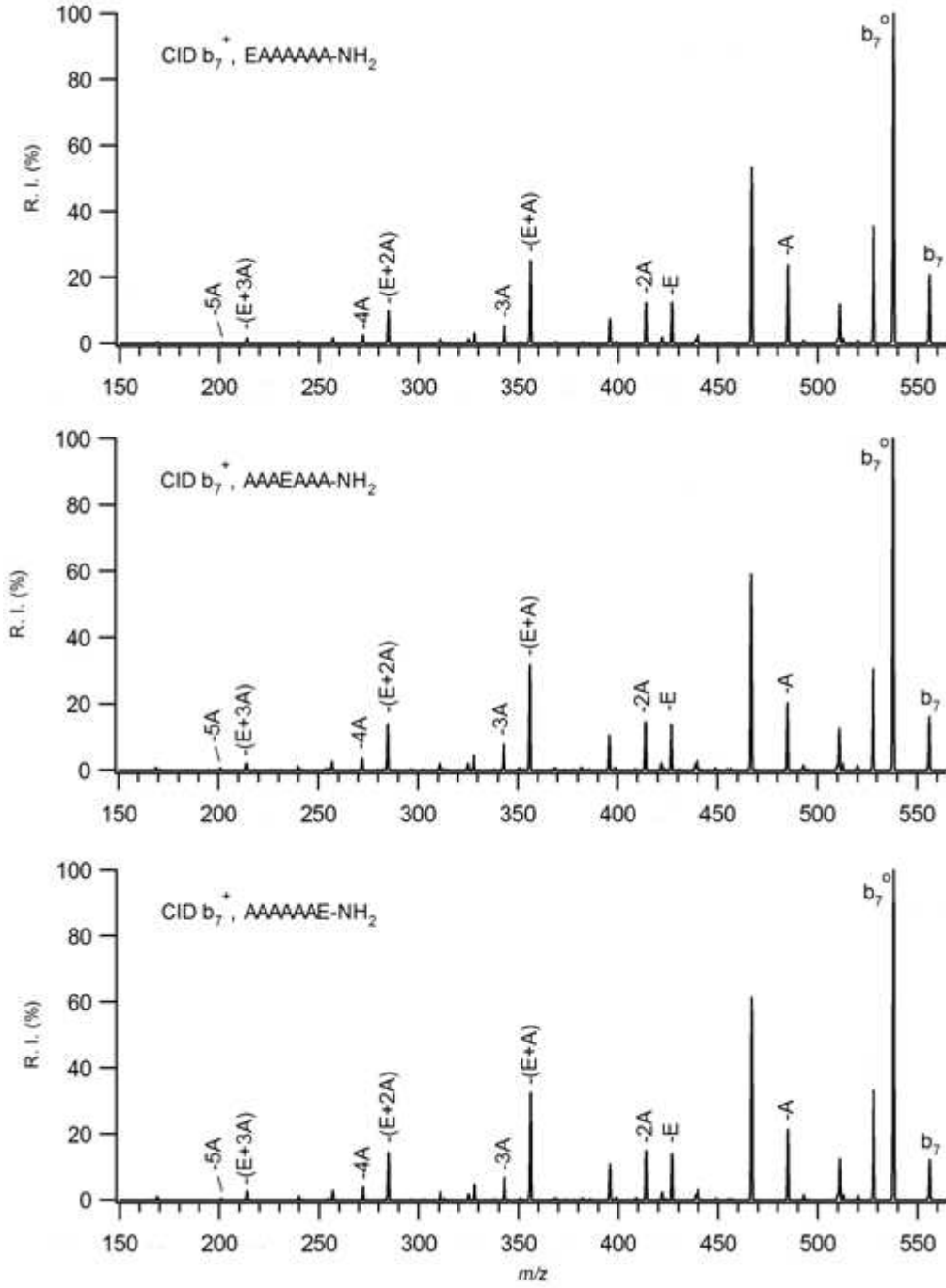
### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Asidik Amino Asit İhtiva Eden Peptit Türevleri:

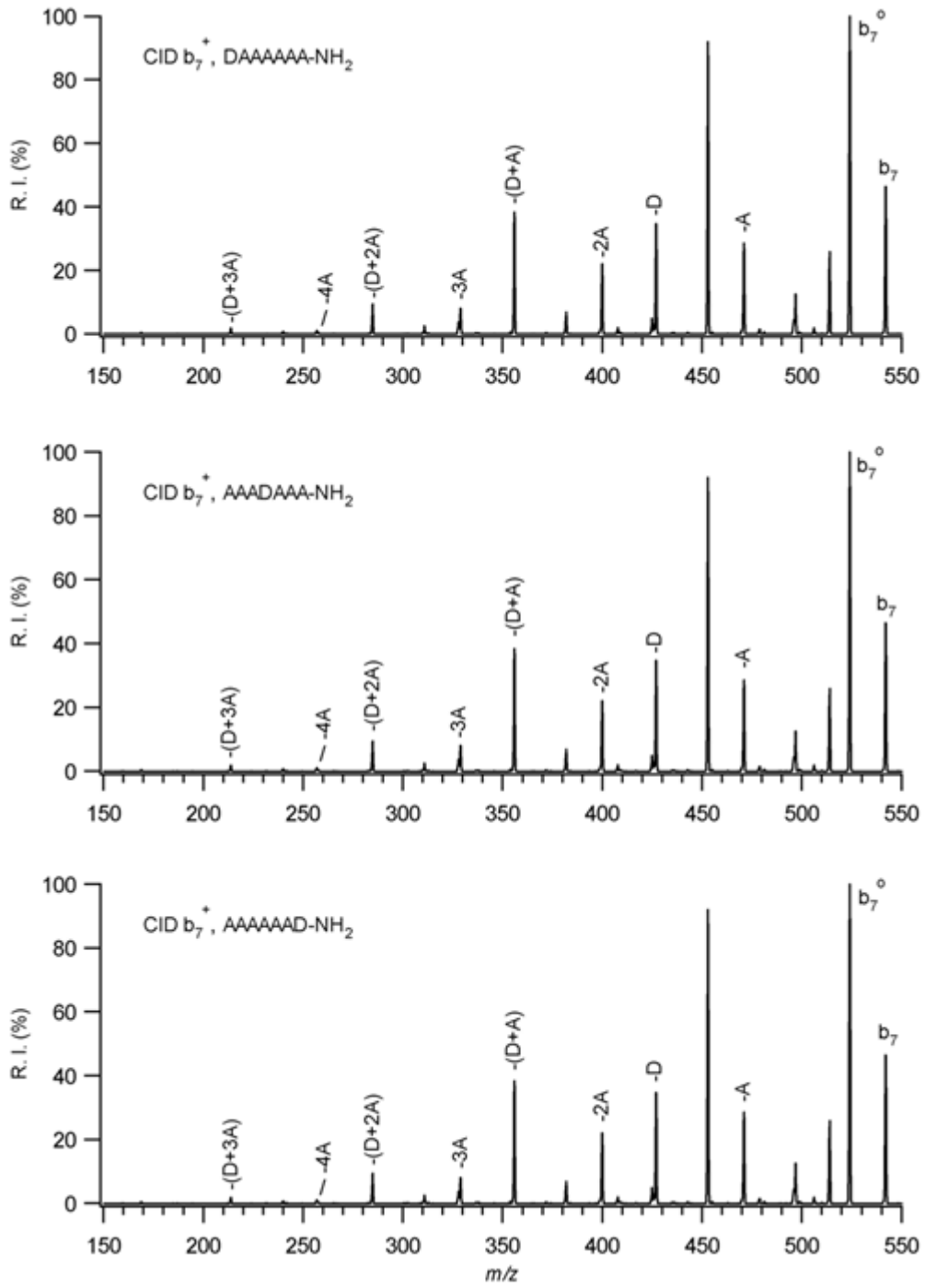
Projenin bu kısmında, peptit zincirinde bulunan asidik amino asitlerin (glutamik asit (E) veya aspartik asit(D)) ve bunların pozisyonlarının *b*-iyon türünün makrosiklik yapı oluşumu sırasındaki etkileri sistematik olarak çalışıldı ve gösterildi. Bu çalışma sırasında ilk set amino asit ve peptit türevleri olarak, XAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AXAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAXAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAXAAA-NH<sub>2</sub>, AAAAXAA-NH<sub>2</sub>, AAAAAXA-NH<sub>2</sub>, AAAAAAX-NH<sub>2</sub>, ve ikinci set peptit türevleri olarak, XXAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAXXAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAAXXAA-NH<sub>2</sub> ve AAAAAAXX-NH<sub>2</sub> peptitleri sentezletirildi. Buradaki "X" olarak gösterilen amino asit ise, glutamik asit veya aspartik asit olarak sentezletirilmişdir. Bu sayede tekli veya ardışık ikili grup olarak sentezletirilen bu asidik peptit türevlerinin makrosiklik yapı oluşumuna etkileri sistematik bir şekile çalışıldı.

#### 3.1.1. Glutamik veya Aspartik Asit İhtiva Eden Heptapeptit Türevlerinin Makrosiklik Oluşumuna Etkileri:

Glutamik asit veya aspartik asit içeren peptit türevlerinin pozisyona bağlı olarak makrosiklik yapının oluşmasına etkilerini detaylandırmak için her bir MH<sup>+</sup> kütle spektrumunda en yüksek şiddete sahip olan *b*<sub>7</sub> iyonları ayrı ayrı izole edilerek MS/MS deneyleri yapılmıştır. Asidik amino asitin pozisyonu ne olursa olsun her bir kütle spektrumu birbirinin aynısı çıkmıştır (sonuç gösterilmemiştir). Şekil 8 ve Şekil 9'da yedi izomerden sadece üçer tanesi gösterilmiştir. Hem glutamik asit hem de aspartik peptit izeomerleri kendi içlerinde birbirlerinin aynısıdır. Bu sonuçlar makrosiklik yapının oluştuğunun bir kanıtıdır. Başka hiçbir şekilde spektrumlar birbirlerinin aynısı olamaz. Makrosiklik yapının oluşmasında asidik amino asitin ve pozisyonun herhangi bir etkilerinin olmadığı bu şekillerde açıkça gösterilmiştir.



Şekil 8. Sekansında glutamik asit bulunan peptit türevlerinden elde edilen  $b_7$  iyonlarının MS/MS kütle spektrumu.



Şekil 9. Sekansında aspartik asit bulunan peptit türevlerinden elde edilen  $b_7$  iyonlarının MS/MS kütle spektrumu.

### 3.1.2. *Ardışık Glutamik veya Aspartik Asit İhtiva Eden Octapeptit Türevlerinin Makrosiklik Oluşumuna Etkileri:*

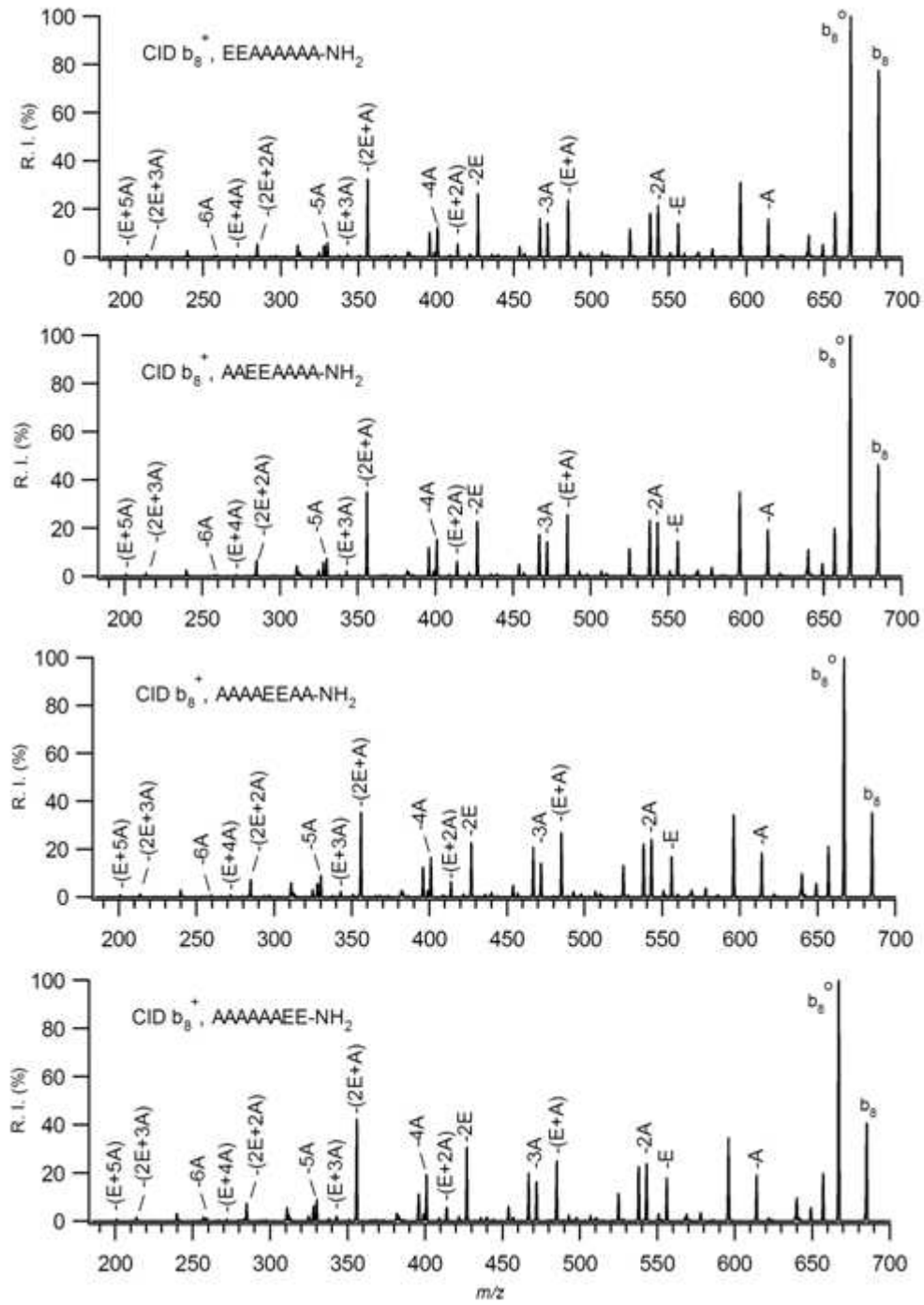
Peptit türevlerinin tek bir asidik grup içeren serilerinde herhangi bir farklılık gözlenmemesi üzerine ardışık asidik amino asit içeren peptit türevleri detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Burdaki amaç yan yana bulunan asidik amino asitlerin makrosiklik yapının oluşumuna etkisini araştırmaktır. Ayrıca bu ikili asidik grubun pozisyonuna bağlı nasıl davranacağı detaylı bir şekilde çalışılmıştır.

Şekil 10 ve 11’de peptit türevlerinden elde edilen  $b_8$  iyonlarının MS/MS kütle spektrumları verilmektedir. Şekillerden de görüleceği üzere kütle kütle sinyalleri tek bir asidik grup içeren peptit türevlerine göre daha karmaşık bir durum arz etmektedir. Fakat sonuç itibari ile iki glutamik asit içeren peptit türevlerinde de herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 10). Pozisyonu ne olursa olsun asidik gruplar makrosiklik yapının bir göstergesi olan bire bir aynı kütle sinyalleri göstermiştir. Aynı çalışma aspartik asit ihtiva eden gruplar ile de yapılmış ve aynı sonuç gözlenmiştir (Şekil 11).

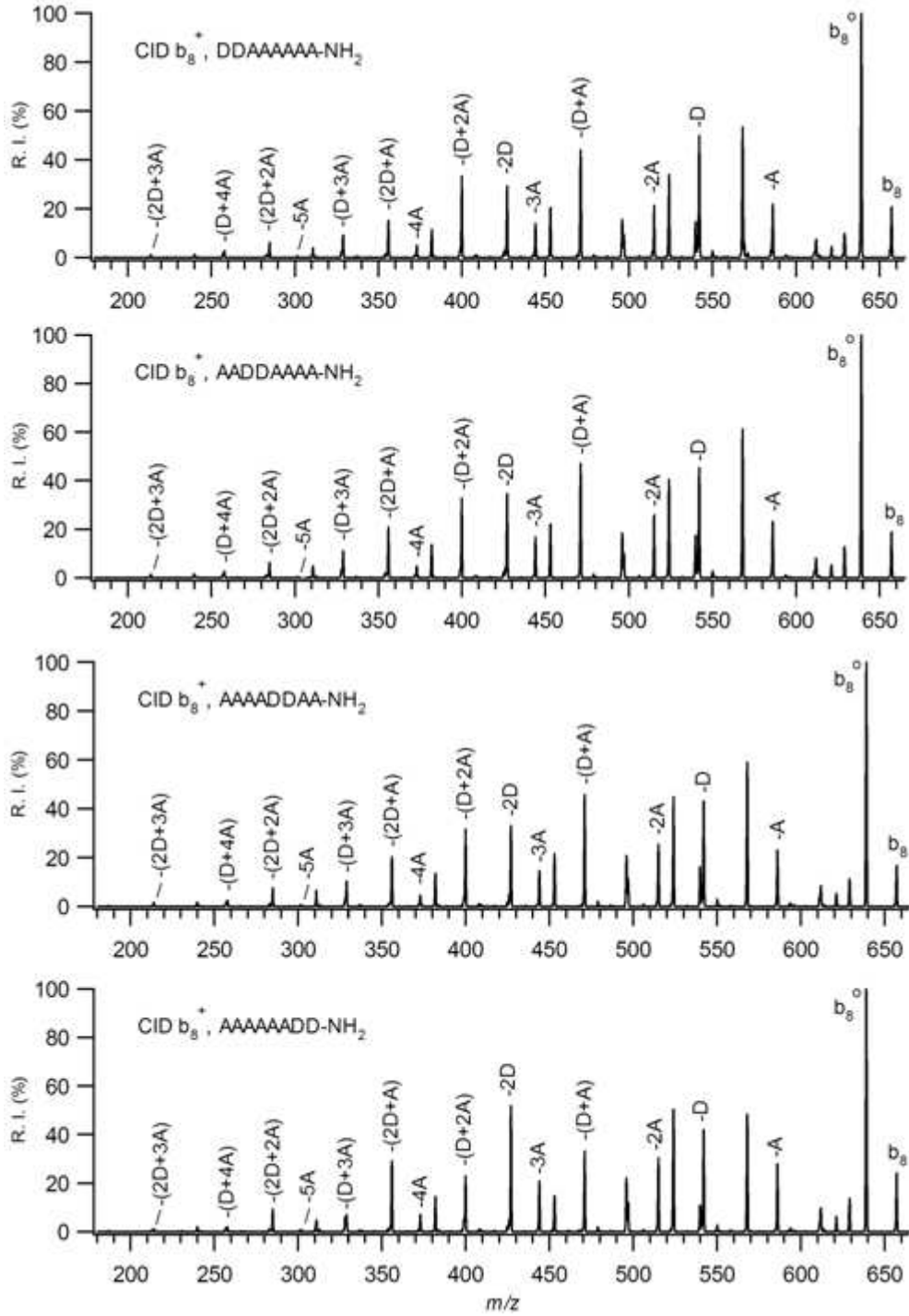
Kütle spektrumlarında görülen  $b_7^+$  ve  $b_8^+$  iyonları ilgili iyondan su kopmaları olarak belirtilmiştir. Model peptitler glutamik asit ve aspartik asit içerdiği için su kopmalarının da bu amino asitlerin yan zincirlerinde var olan  $-OH$  grupları tarafından oluştuğu yazılan mekanizma ile açıkça gösterilmiştir (Şekil 12). AAEEAAAA-NH<sub>2</sub> model peptitinden elde edilen  $b_8$  iyonundan su kopması ve makrosiklik yapının oluşması Şekil 12’de gösterilmiştir.

AAEEAAAA-NH<sub>2</sub> model peptitinden elde edilen  $b_8$  makrosiklik yapı sekiz değişik halka açılma yolu gösterebilir. Makrosiklik yapının açılma pozisyonları Şekil 13’de belirtilmiştir.

Şekil 14’de her bir seriden seçilmiş peptitlerin çarpışma enerjisine bağlı olarak oluşan makrosiklik yapının açılması ve asidik amino asitlerin makrosiklik yapıdan kopmaları ile yapılan çalışmalar verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere tekli asidik grup içeren amino asit serisinde glutamik asit serisi aspartik asit serisine göre daha kararlı bir yapıdadır. Aspartik asit serisi düşük enerjide parçalanmaya başlarken (yaklaşık olarak 20 eV civarında), glutamik asit serisi için daha yüksek enerjiye (yaklaşık olarak 25 eV) ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da glutamik asit ile aspartik asitin yan zincirlerindeki  $-CH_2$ ’den kaynaklandığı düşünülmektedir. İkili asidik grup içeren peptit türevlerinde tekli asidik grubun kopma mekanizmaları bir farklılık göstermezken, ikili asidik grupların kopmaları daha düşük profil göstermiştir.

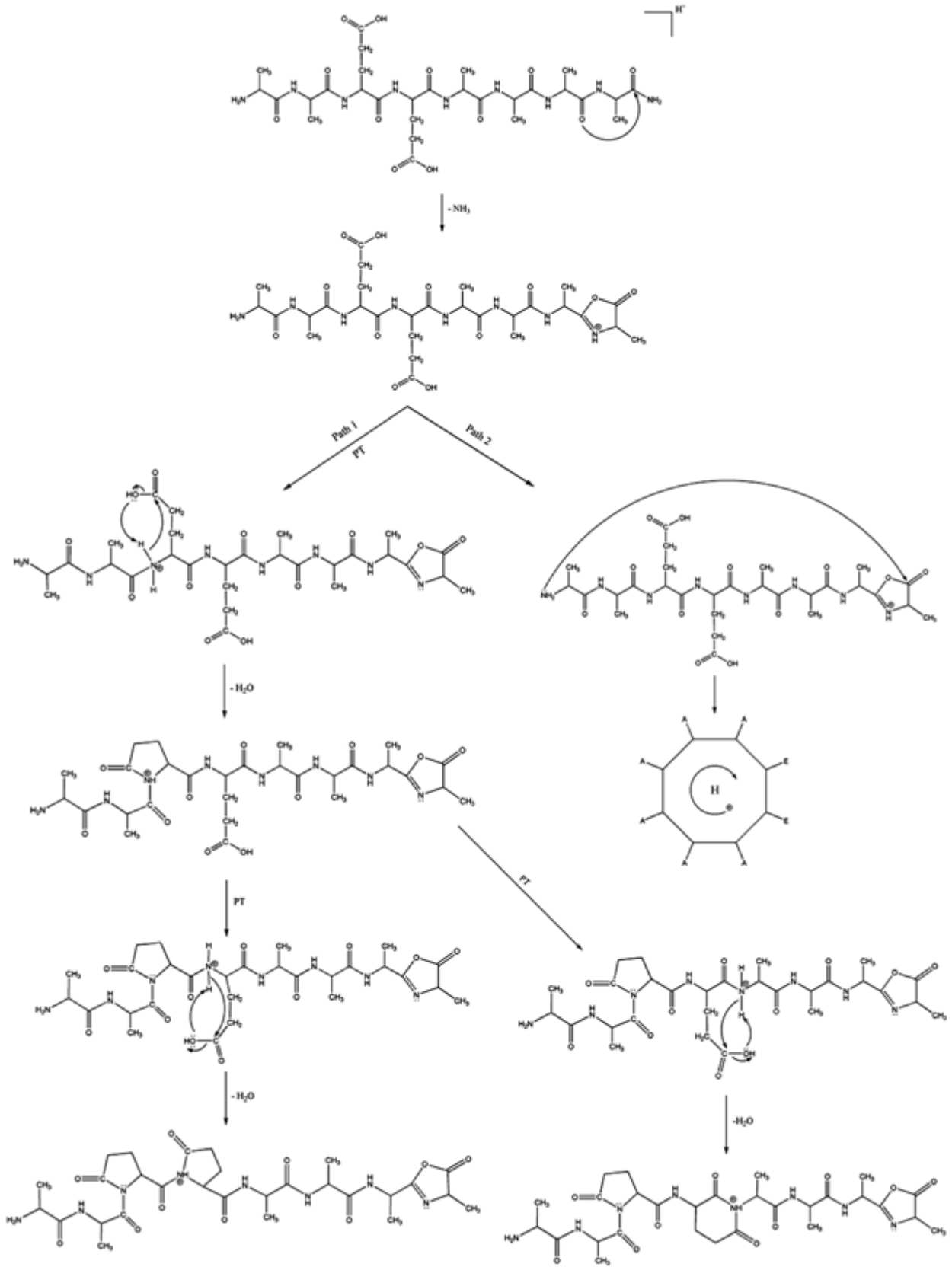


Şekil 10. Sekansında iki tane glutamik asit bulunan peptit türevlerinden elde edilen  $b_8$  iyonlarının MS/MS kütle spektrumu.

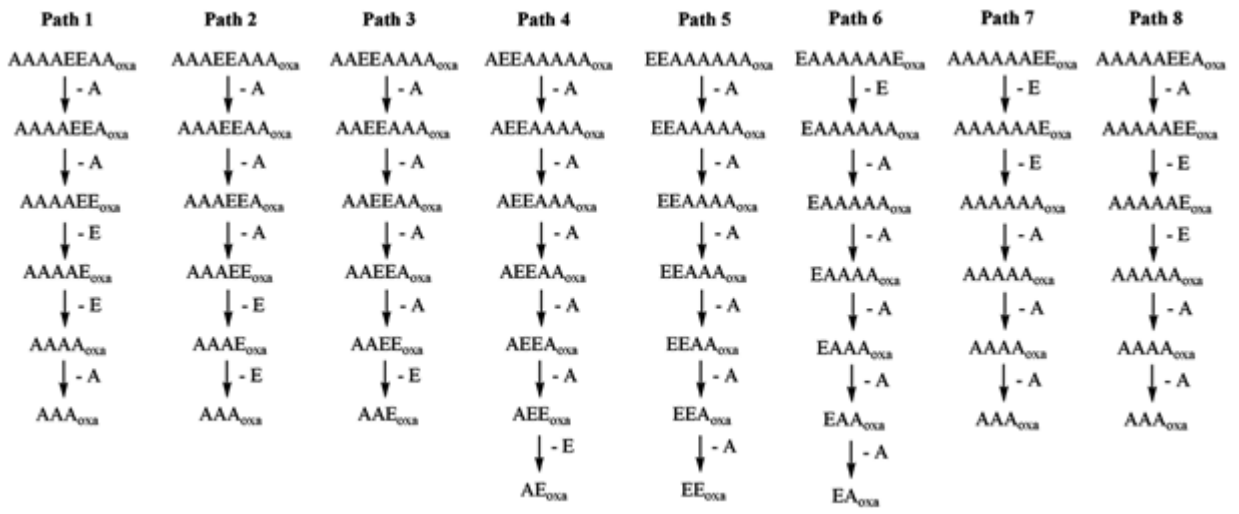
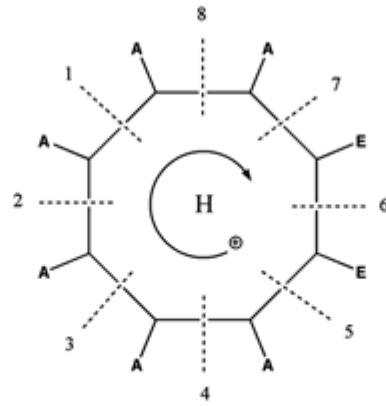


Şekil 11. Sekansında iki tane aspartik asit bulunan peptit türevlerinden elde edilen  $b_8$  iyonlarının MS/MS kütle spektrumu.

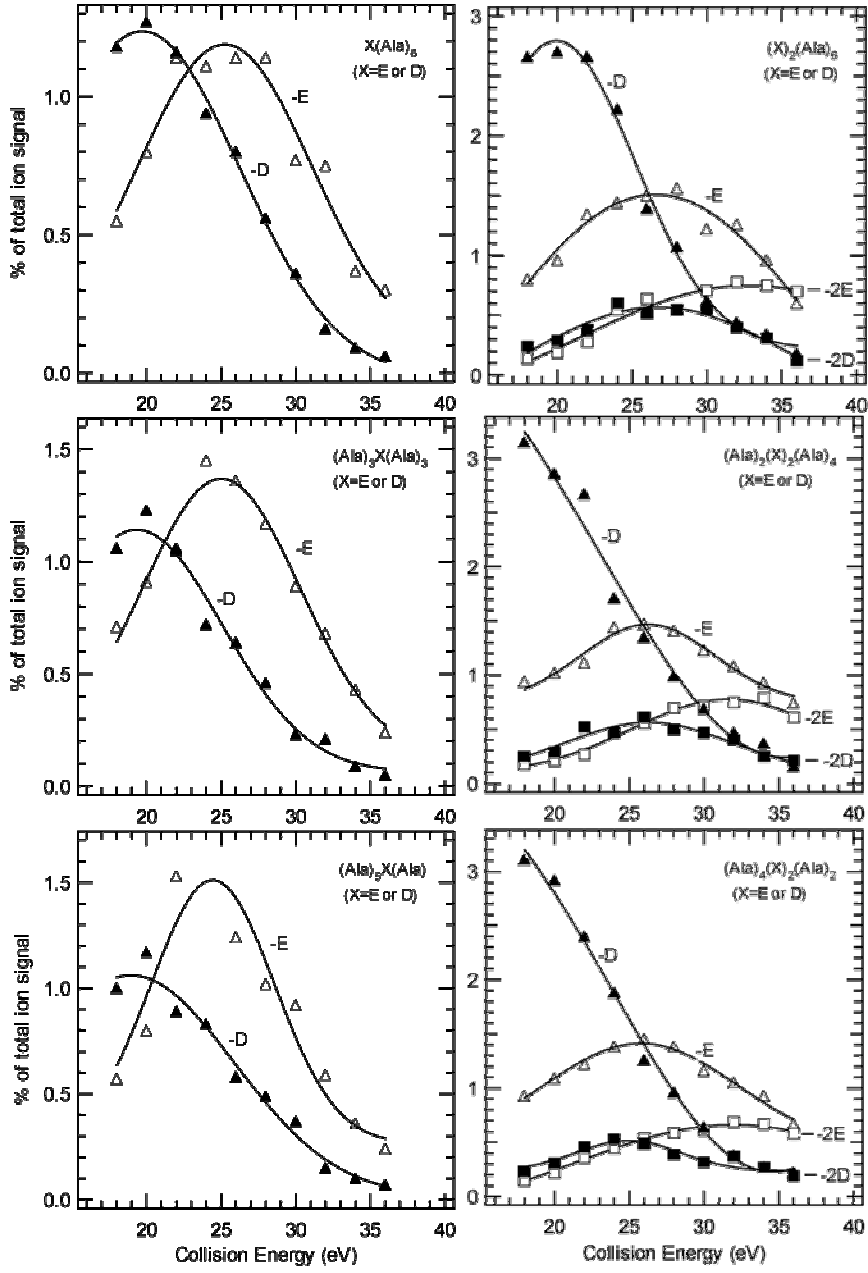




Şekil 12. AAEEAAA-NH<sub>2</sub> peptit türeviden elde edilen b<sub>8</sub> iyonundan su kopması ve makrosiklik b<sub>8</sub> iyon oluşum mekanizmaları



Şekil 13. Makrosiklik  $b_8$  iyonu ve sekiz değişik siklik yapının açılma pozisyonları



a

b

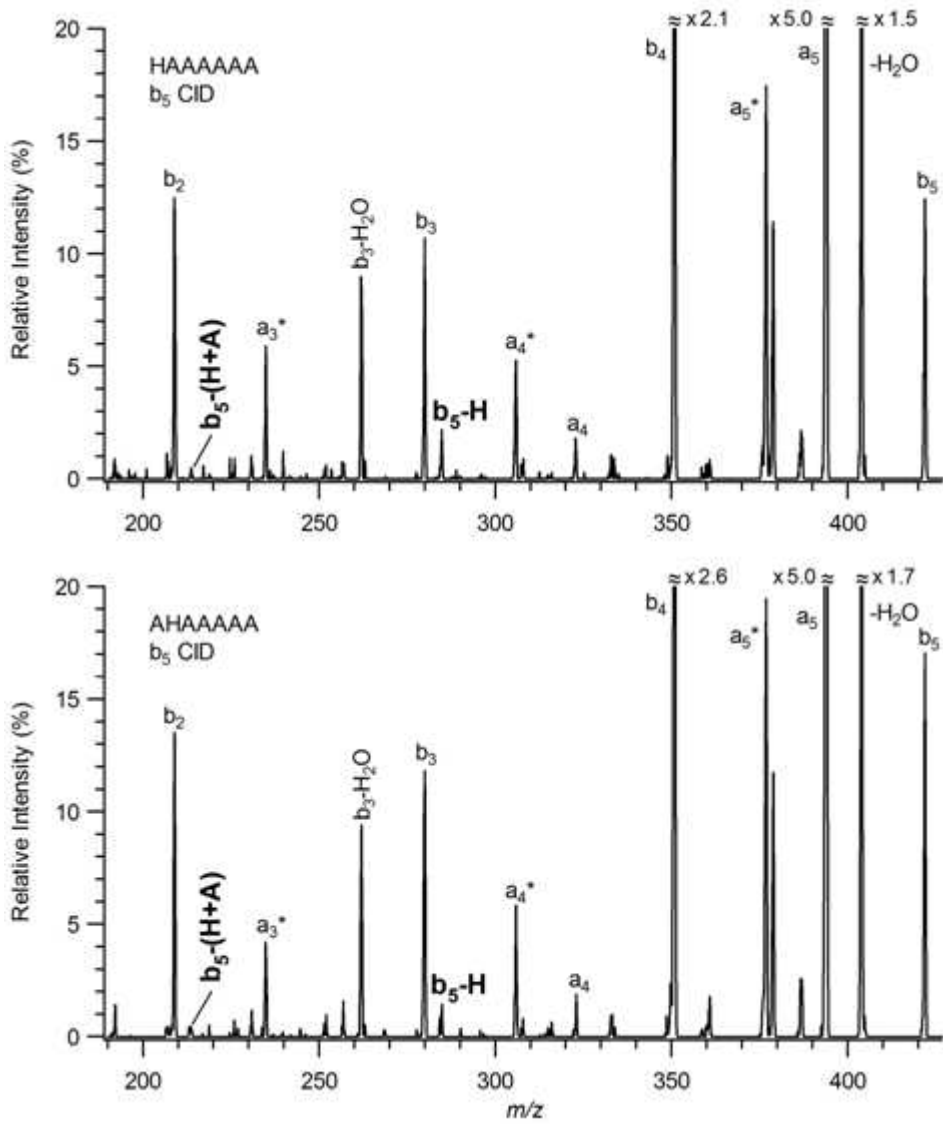
Şekil 14. Tekli ve ikili asidik grup içeren peptit türevlerinin enerjiye bağlı asidik grupların makrosiklik yapıdan kopma profilleri.

### 3.2. Sekansında Histidin Amino Asit Grubu Bulunduran Peptit Türevleri

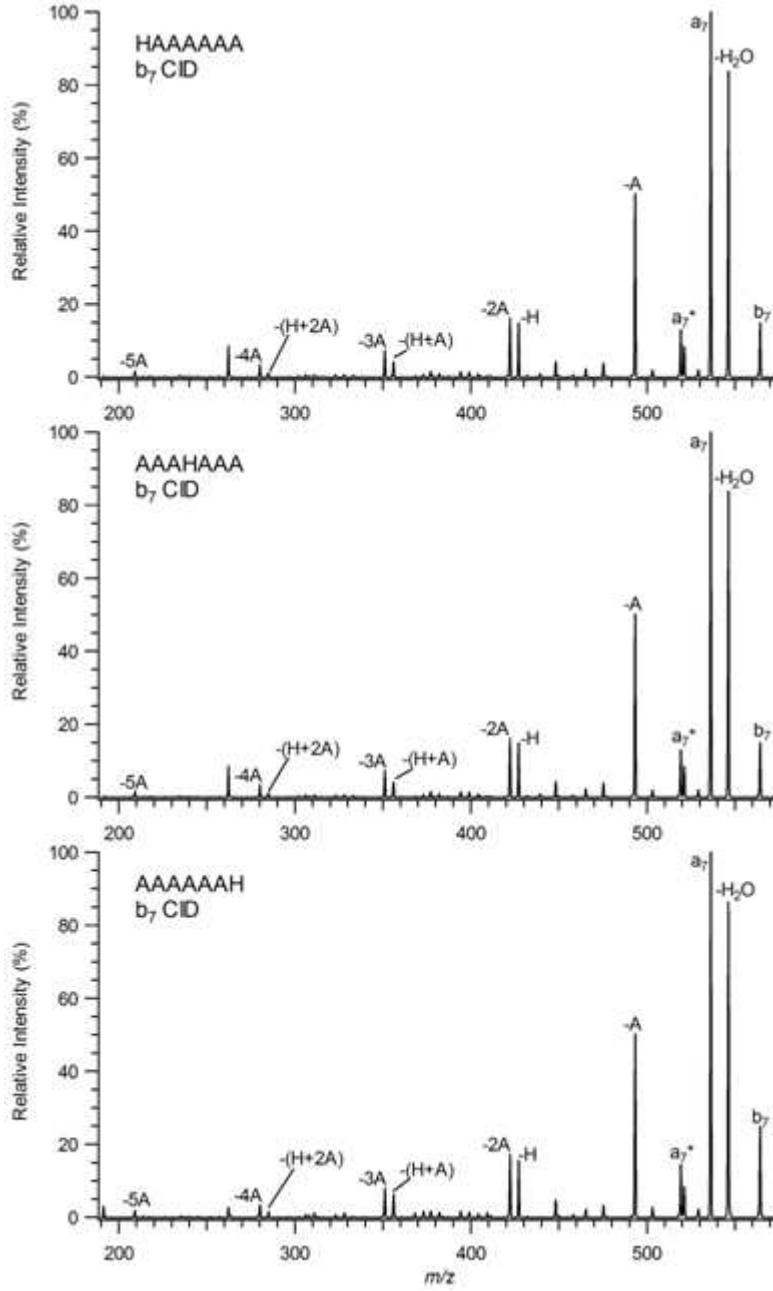
2010 yılında Harrison ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada HAAAAA-OH, AHAAAAA-OH, AAHAAA-OH, AAAHAA-OH, AAAAHA-OH peptit serisi kullanılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki histidin ihtiva eden bu seride histidinin peptit serisi içindeki pozisyonu makrosiklik yapının oluşmasında önem arz etmektedir. Yapılan incelemede histidin peptitin N-terminal pozisyona yakınsa makrosiklik yapının oluşup oluşmadığı konusunda deneysel bir sonuç elde edilemezken, peptitin C-terminal pozisyonuna yaklaştığında makrosiklik yapının oluştuğu hakkında deneysel sonuç elde edilmiştir. Bu çalışma sırasında  $b_5$  iyonları zıval edilerek sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

Bu rapor döneminde bazik özelliğine sahip olan histidin ihtiva eden HAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AHAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAHAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAHAAA-NH<sub>2</sub>, AAAAHAA-NH<sub>2</sub>, AAAAHA-NH<sub>2</sub> and AAAAAAH-NH<sub>2</sub> peptit serisi ile HYAGFLV-NH<sub>2</sub>, YAGHFLV-NH<sub>2</sub> ve YAGFLVH-NH<sub>2</sub> peptit serileri ile detaylı çalışmalar yapılmıştır.

Şekil 15’de görüldüğü üzere elde edilen sonuçlar Alex ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile uyumluluk içerisindedir. Histidin peptitin N-terminal pozisyonuna yakın olduğunda makrosiklik yapının göstergesi olan direk olmayan parçalanma ürünlerinin gürültü seviyesinde olduğu gözlenmiştir. Örnekleme yapıldığında bakılan  $b_5\text{-H}$  ve  $b_5\text{-(H+A)}$  iyonlarının sinyal şiddetlerinin yok denecek kadar az olduğu gözlenmektedir. Yüzde olarak bakıldığında  $b_5\text{-H}$  iyonunun sinyal şiddeti %1-2 civarındayken,  $b_5\text{-(H+A)}$  iyonunun sinyal şiddeti hemen hemen %0.5-1 civarında görülmektedir. Bundan dolayı Alex ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada histidin amino asidinin bazik özelliğinden dolayı böyle bir davranış gösterdiği düşünülmüştür. Fakat laboratuvarımızda yapılan detaylı çalışmada bu gözlemin pek de doğru olmadığı gösterilmiştir. Şekil 16’da gösterildiği üzere, histidin’in pozisyonu ne olursa olsun makrosiklik yapının oluştuğu deneysel olarak görülebilmektedir. Makrosiklik yapının göstergesi olan direk olmayan iyon türlerinden  $\text{-H}$ ,  $\text{-(H+A)}$ ,  $\text{-2A}$ ,  $\text{-3A}$ ,  $\text{-4A}$ ,  $\text{-5A}$  iyonlarının pozisyon ne olursa olsun net olarak gözlenmesidir. Özellikle  $b_7\text{-H}$ , ve  $b_7\text{-(H+A)}$  iyonlarının sinyal şiddetleri %10-15 ve %5 civarında gözlenmektedir ki, buda  $b_5\text{-H}$  ve  $b_5\text{-(H+A)}$  sinyal şiddetinden yaklaşık olarak 10 kat daha güçlüdür.



Şekil 15. HAAAAAA-NH<sub>2</sub> ve AHAAAAA-NH<sub>2</sub> peptitlerinde izole edilen  $b_5$  iyonunun MS<sup>3</sup> kütle spektrumu.

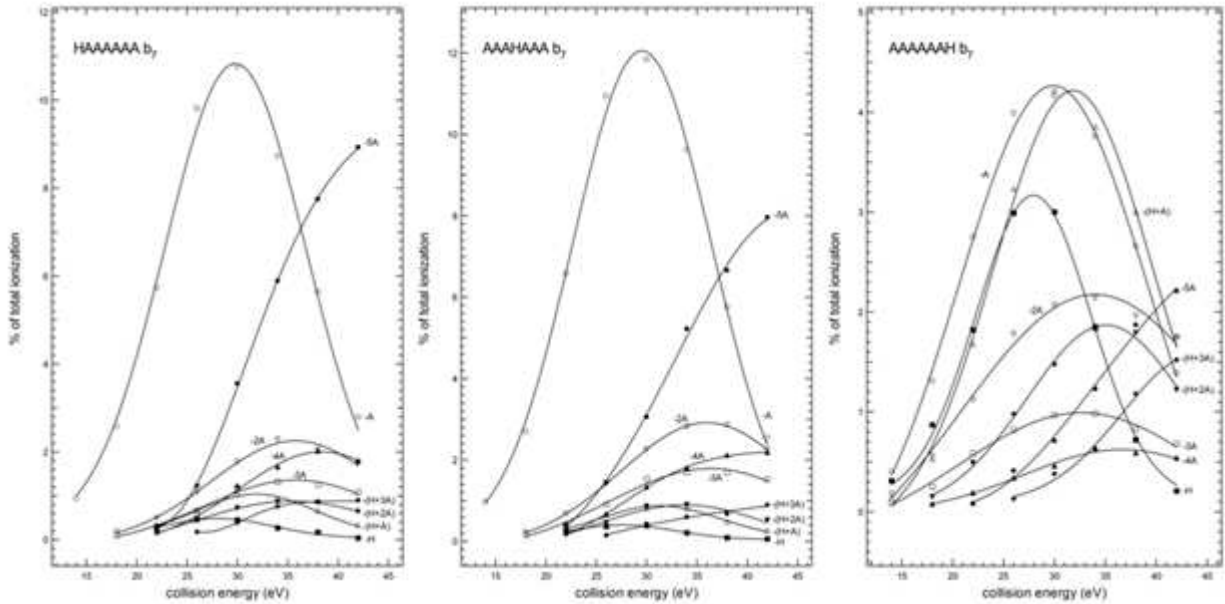


Şekil 16. HAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAHAAA-NH<sub>2</sub> ve AAAAAAH-NH<sub>2</sub> peptitlerinden izole edilen *b*<sub>7</sub> iyonunun MS<sup>3</sup> kütle spektrumu.

HYAGFLV-NH<sub>2</sub>, YAGHFLV-NH<sub>2</sub> ve YAGFLVH-NH<sub>2</sub> peptit serileri ile yapılan detaylı çalışmalar göstermektedir ki makrosiklik yapının göstergesi olan direk olmayan parçalanma ürünlerin sinyal şiddetleri %5 ila %30 civarında değişmektedir. Şekil 17’de gösterildiği gibi *b*<sub>7</sub>-Y, *b*<sub>7</sub>-F, *b*<sub>7</sub>-H, *b*<sub>7</sub>-L, *b*<sub>7</sub>-V, *b*<sub>7</sub>-A iyonları direk olmayan parçalanma iyonlarıdır ve sinyal şiddetleri yukarıda belirtildiği üzere kabul edilebilir bir şiddettedirler.

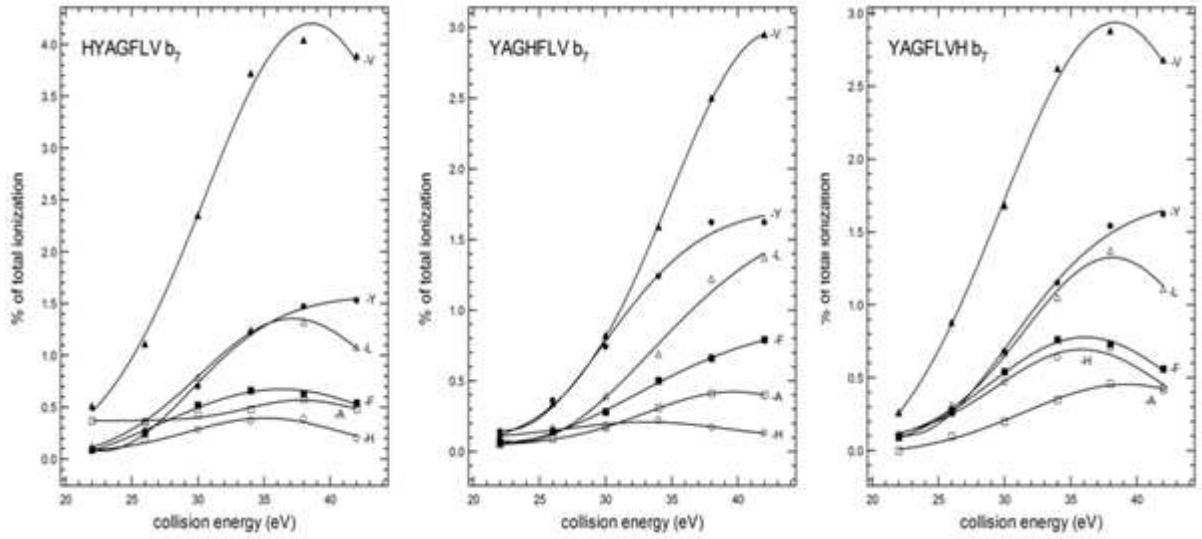
Sadece **b<sub>7</sub>-G** iyonunun sinyal şiddeti %2-3 civarında olarak gözlenmektedirki bu da glisin amino asidinin en düşük bazikliğe sahip olması ile tanımlanabilir.

Ayrıca, enerjiye bağlı parçalanma eğilimlerinin incelenmesi için yapılan çalışmada, HAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAHAAA-NH<sub>2</sub> ve AAAAAAH-NH<sub>2</sub> peptitleri kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 17’de verilmektedir. Şekilden de görüleceği üzere direk olmayan parçalanma ürünleri gözönüne alınarak yapılan grafikte histidin ister peptitin **N-terminal** pozisyonunda bulunsun isterse tam ortada bulunsun elde edilen "break-down" diye adlandırılan profilleri hemen hemen aynı olduğu halde, histidin peptitin **C-terminal** pozisyonunda bulunduğu tamamiyle farklı profil göstermiştir.



Şekil 17. HAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAHAAA-NH<sub>2</sub> ve AAAAAAH-NH<sub>2</sub> peptit türevlerinin direk olmayan parçalanma ürünlerinin enerjiye bağlı kopma profilleri.

Fakat, HYAGFLV-NH<sub>2</sub>, YAGHFLV-NH<sub>2</sub> ve YAGFLVH-NH<sub>2</sub> ile yapılan enerjiye bağlı parçalanma eğilimleri incelendiğinde, bir önceki sonucun tam aksine her üç peptit türünde de profiller hemen hemen aynı çıkmıştır. Bu sonuçlar Şekil 18’de verilmektedir. Bunun sebebi hala tam olarak anlaşılamamıştır ve bu konuda detaylı çalışmalar laboratuvarımızda devam etmektedir. Buradaki çalışmadan çıkarılacak sonuç, makrosiklik oluşumunda komşu amino asitler etkide bulunabilmektedir.

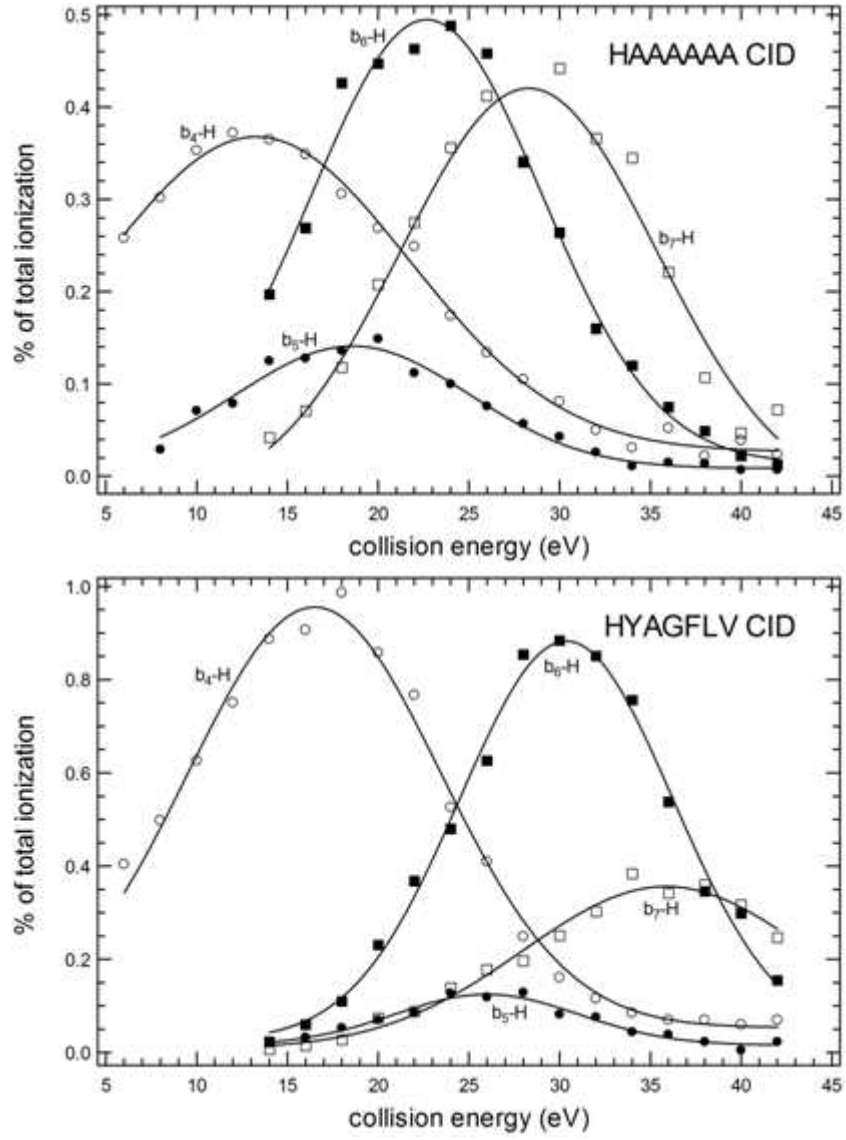


Şekil 18. HYAGFLV-NH<sub>2</sub>, YAGHFLV-NH<sub>2</sub> ve YAGFLVH-NH<sub>2</sub> peptit türevlerinin direk olmayan parçalanma ürünlerinin enerjiye bağlı kopma profilleri.

Bütün bu çalışmalardan çıkan sonuç, Alex ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın aksine yapılan deneylerde gösterilmiştir ki, histidin pozisyonu ne olursa olsun makrosiklik yapı oluşturmakta ve deneysel olarak bu açıkça gözlenmektedir. Bunun sebebi **b<sub>5</sub>** iyonu ile yapılan çalışmalarda bu gözlem yapılamadığı için tamamiyle **b** iyonun ihtiva ettiği amino asit sayısı ile ilgili olduğu açıktır. Bizim yaptığımız bütün çalışmalarda **b<sub>7</sub>** iyonu izole edilmiş ve deneyler buna göre kurgulanmıştır. Bu güne kadar bu konu ile ilgili literatürde yapılan bütün çalışmalarda **b<sub>5</sub>** iyonları izole edilmiş ve deneyler bunlara göre kurgulanmıştır. Fakat yapılan bu çalışma göstermiştir ki **b<sub>5</sub>** iyonu bir sebepten dolayı çok iyi sonuç vermemektedir ve makrosiklik yapının deneysel olarak gözlenememesinin temel sebebidir.

Makrosiklik yapıların hangi büyüklükte daha kararlı olduğunu gözlemlemek için yapılan **b<sub>n</sub>-H** (n=4,5,6 ve 7) iyonunun enerjiye bağlı parçalanma profillerinin sonuçları Şekil 19'da verilmektedir. Siklik yapının hangi büyüklükte ve hangi enerjide daha kararlı olduğunun bir göstergesi olan bu çalışma sonucu göstermiştir ki **b<sub>5</sub>** iyonu en az kararlı ve en düşük sinyal şiddetine sahip olmaktadır. Profillerde açıkça gözlenmektedir ki, **b<sub>4</sub>-H**, **b<sub>6</sub>-H**, ve **b<sub>7</sub>-H** profilleri, her iki peptit türevinde de **b<sub>5</sub>-H** iyonuna göre daha ve kararlı bir profil göstermiştir. Bu sonuçta görüleceği üzere Alex ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada öne sürülen sonuçlar tamamiyle seçilen ve bütün deneylerin kurgulandığı **b<sub>5</sub>** iyonundan kaynaklanmaktadır.





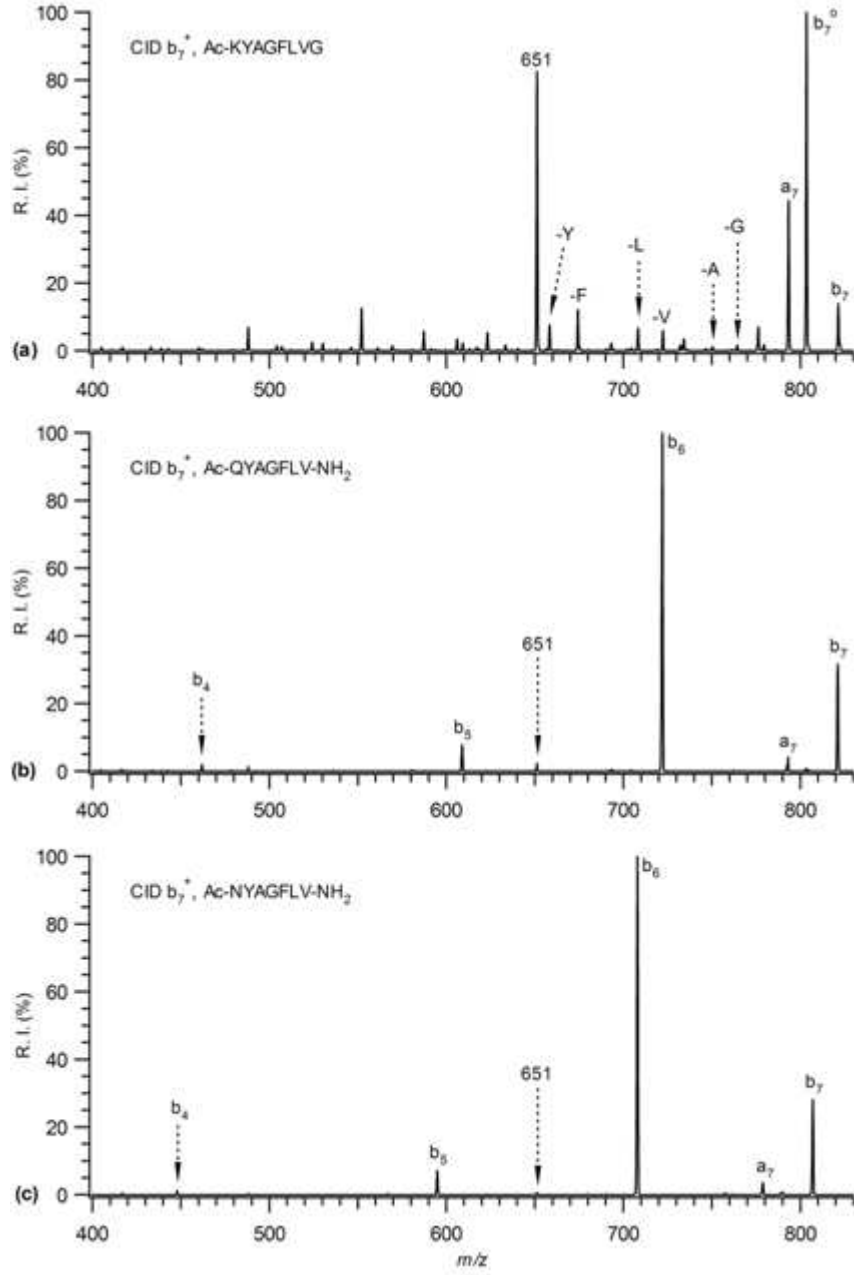
Şekil 19.  $b_n-H$  ( $n=4,5,6$  ve  $7$ ) iyonunun enerjiye bağlı parçalanma profilleri

### 3.3. Sekansında Lizin Amino Asit Grubu Bbulunduran Peptit Türevleri

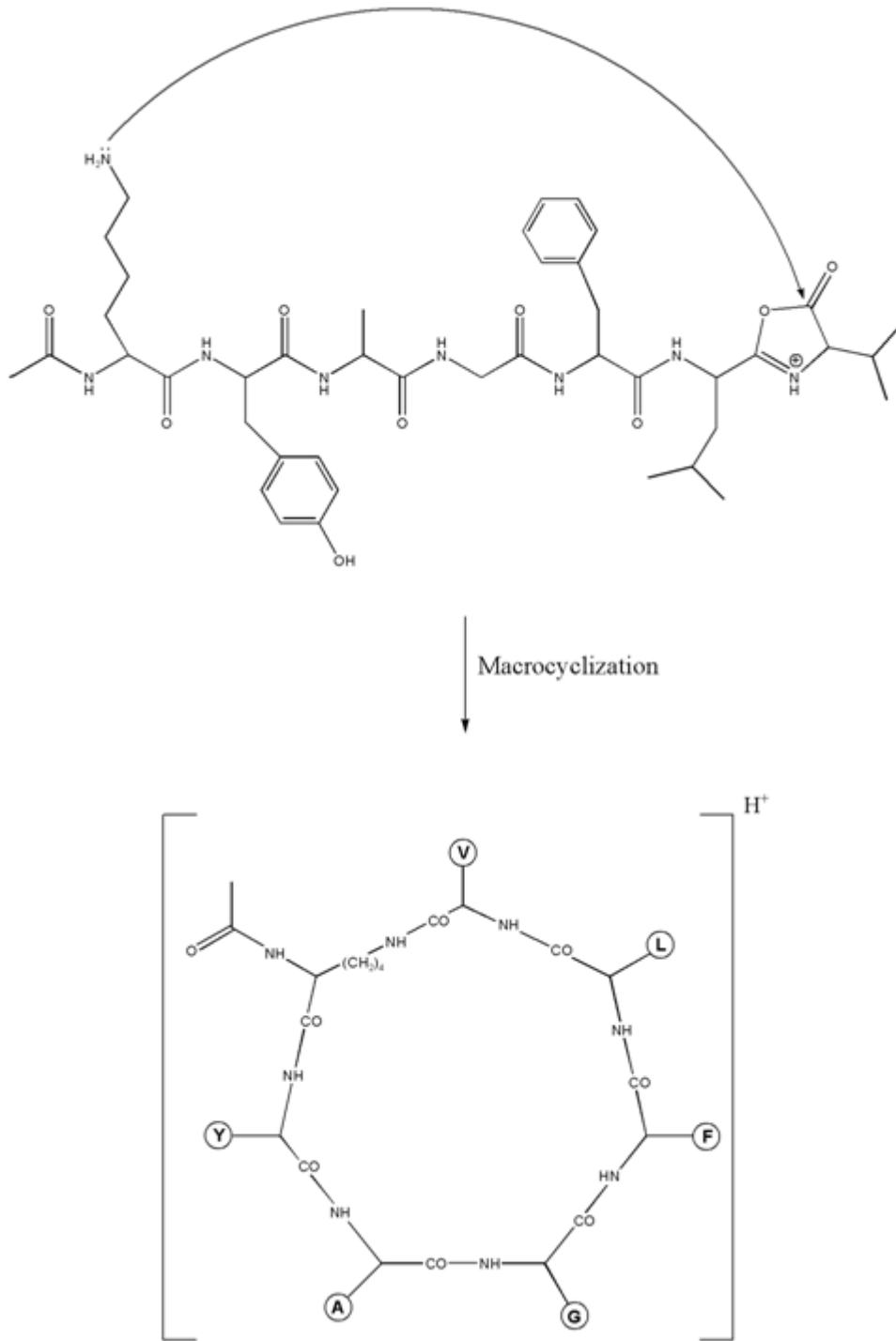
Bilindiği üzere, gaz-fazında makrosiklik *b* iyonunun oluşması için peptitin N-ucunun serbest amin (-NH<sub>2</sub>) grubu içermesi gerekmektedir. *b* iyonlarının halkalaşma reaksiyonu N-ucu asetillenmiş peptitlerde tamamen engellendiği deneysel olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada *b* iyonlarının halkalaşmasında N-ucu asetillenmiş peptitlerin birinci pozisyonlarındaki lizin (K), glutamin (Q) ve asparajinin (N) amino asitlerinin herhangi bir etkisinin var olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amino asitin ortak özellikleri ise her üçünün de yan zincirlerinde serbest amin grubu içermesidir ki N-uc pozisyonundaki serbest amino asit grubunun halkalaşma reaksiyonuna doğrudan etkisi olduğu bir çok defa Alex ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir.

Model olarak kullanılan Ac-KYAGFLVG, Ac-QYAGFLV-NH<sub>2</sub> ve Ac-NYAGFLV-NH<sub>2</sub> peptitleri ile yapılan deney sonuçları Şekil 20’de verilmektedir. Her üç peptitten elde izole edilen *b*<sub>7</sub> iyonların CID (çarpışmalı-indüklenmiş ayrışma) kütle spektrumlarını göstermektedir ki lizin amino asiti içeren N-ucu asetillenmiş peptitin (Ac-KYAGFLVG, Şekil 20) kütle spektrumunda direk olmayan *b* iyonlarının varlığı gözlemlenirken, (-Y, -F, -L, -V, -A, ve -G kopmaları) aynı sonuç ne asparajin, ne de glutamin ihtiva eden (Ac-NYAGFLVG-OH ve Ac-QYAGFLVG-OH, Şekil 20) peptit türevleri için gözlenmemiştir. Lizin amino asitini içeren N-ucu asetillenmiş peptitteki direk olmayan *b* iyonlarının varlığı lizinin yan zincirinde var olan serbest *ε-amin* grubunun peptitin C-ucundaki valin okzazoluna nükleofilik olarak saldırması ile makrosiklik *b* iyon yapısının oluştuğunun bir göstergesidir (Şekil 21). Daha sonra bu makrosiklik yapı yedi değişik açılma yolunu izleyerek birbirinin izomeri olan yedi tane düzlemsel olduğu varsayılan okzazolonları oluşturur (Şekil 22).

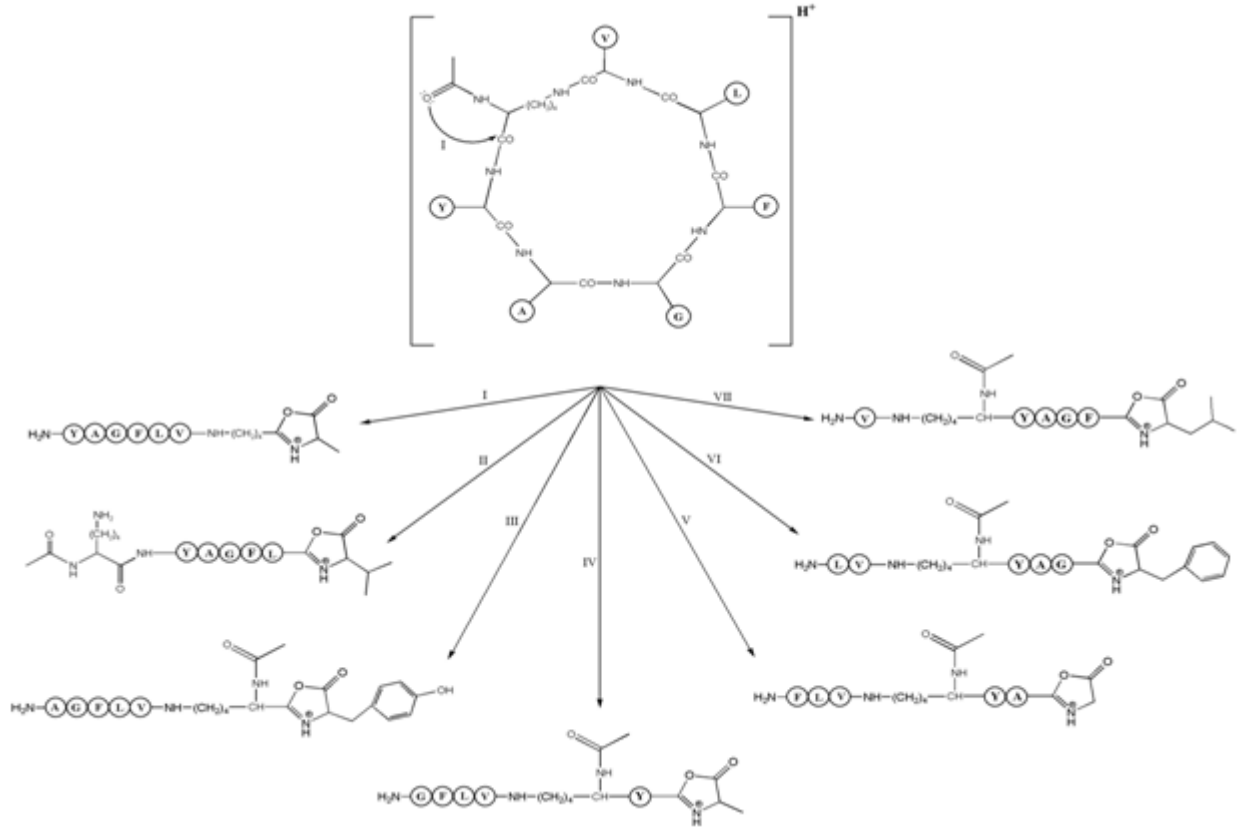
Diğer yandan glutamin ve asparajinin amino asitlerini içeren peptitlerin (Ac-QYAGFLV-NH<sub>2</sub> ve Ac-NYAGFLV-NH<sub>2</sub>, Şekil 20) kütle spektrumları sadece direk *b* iyonlarını (*b*<sub>6</sub>, *b*<sub>5</sub> ve *b*<sub>4</sub>) içermektedir. Herhangi bir direk olmayan *b* iyonlarının varlığı gözlemlenmemiştir. Glutaminin ve asparajinin yan zincirlerinde var olan amin grubuna karbonil grubunun bağlı olması onun nükleofilitesini azalttığı düşünülmekte ve bundan dolayı, bu serbest amin grupları makrosiklik yapıyı oluşturamamaktadır.



Şekil 20. Ac-KYAGFLVG-OH, Ac-QYAGFLV-NH<sub>2</sub> ve Ac-NYAGFLV-NH<sub>2</sub> model peptitlerinden izole edilen  $b_7$  iyonunun MS<sup>3</sup> kütle spektrumu

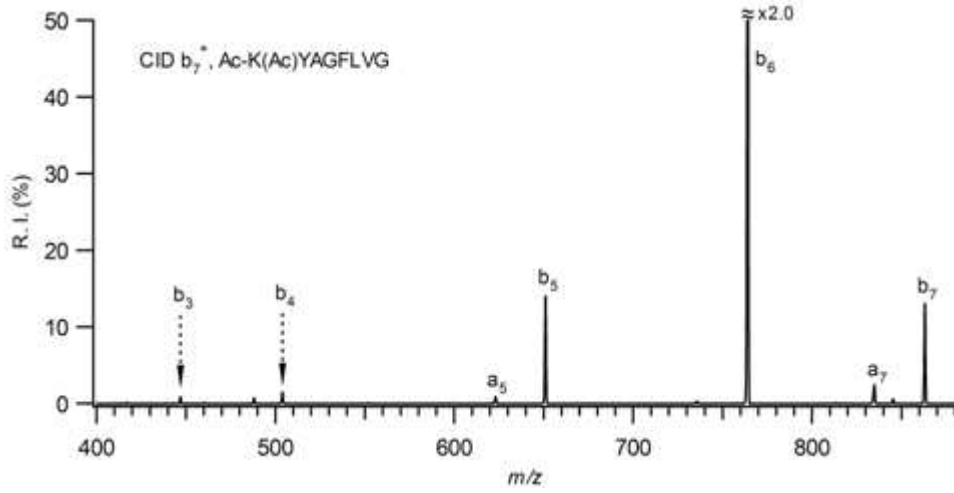


Şekil 21. Ac-KYAGFLVG-OH peptit türevinden elde edilen  $b_7$  makrosiklik iyon oluşum mekanizması.



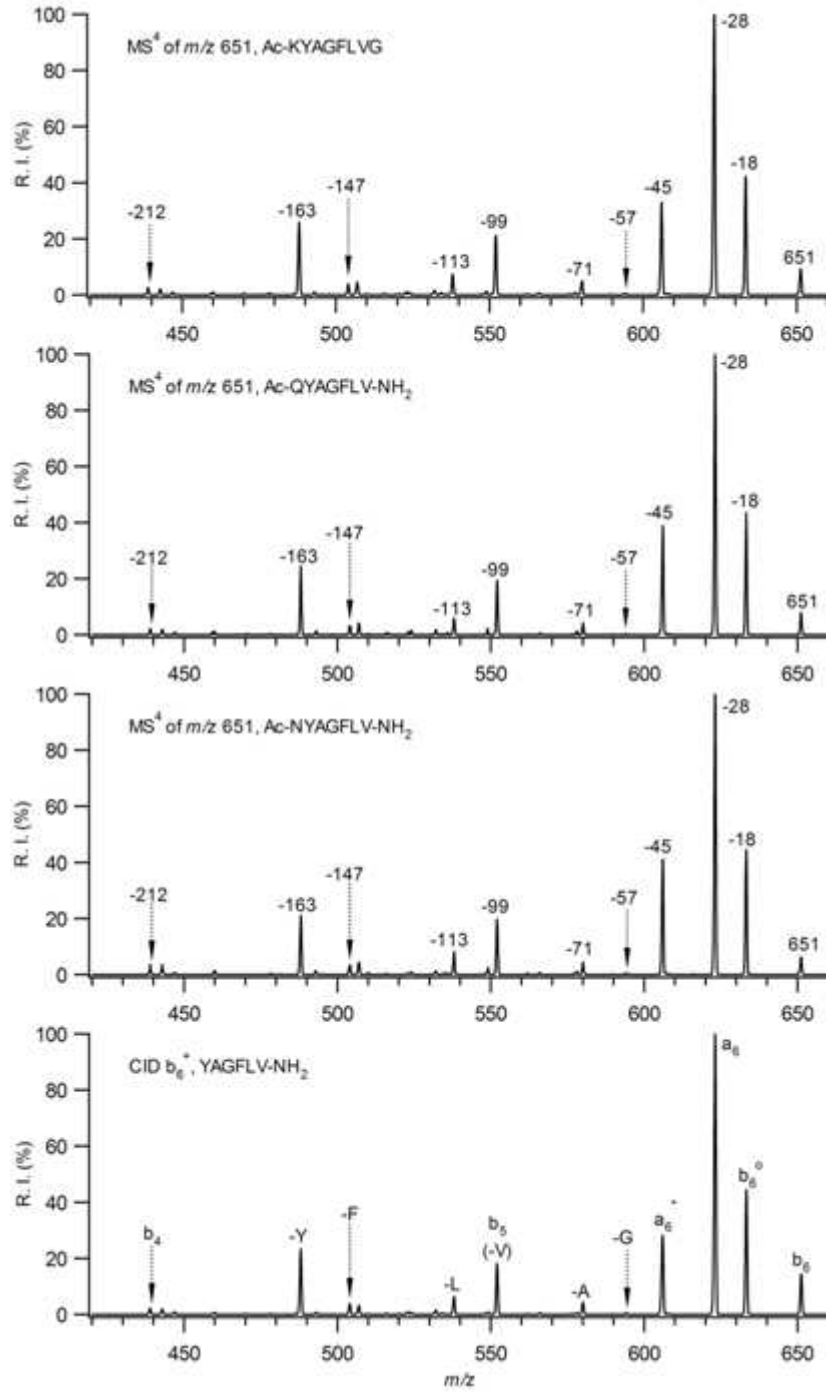
Şekil 22. Ac-KYAGFLVG peptit türevinden elde edilen  $b_7$  makrosiklik iyonunun siklik yapının açılma mekanizması.

Lizin amino asitineki  $\epsilon$ -amin grubunun makrosiklik  $b$  iyonun oluşmasına olan etkisini görebilmek için, hem N-ucu ( $\alpha$ -amin) hem de lizinin yan zincirindeki  $\epsilon$ -amin grubu asetillenmiş olan Ac-K(Ac)YAGFLVG model peptiti tasarlanmıştır. Bu peptitten elde edilen  $b_7$  kütle spektrumuna bakıldığında sadece direk olan  $b$  iyonlarının ( $b_6$ ,  $b_5$ ,  $b_4$  ve  $b_3$ ) varlığı gözlemlenmiştir. Şekil 23 ve Şekil 24 karşılaştırıldığında açıkça görülmüştür ki lizin amino asitininin yan zincirindeki  $\epsilon$ -amin grubunun  $b$  iyonunun makrosiklik yapının oluşmasına etkisi doğrudan vardır.



Şekil 23. Ac-K(Ac)YAGFLVG model peptitinden izole edilen  $b_7$  iyonunun MS<sup>3</sup> kütle spektrumu

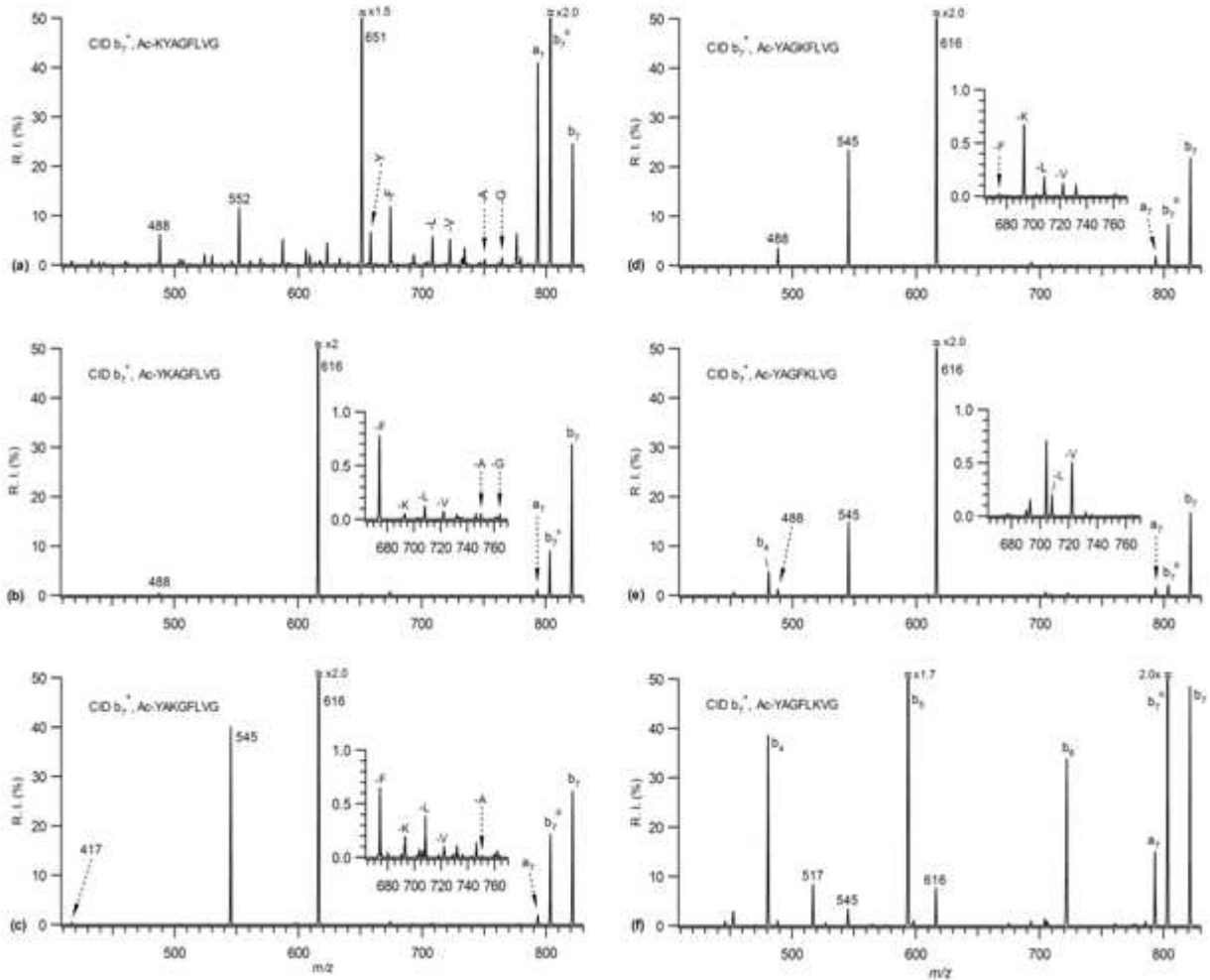
Şekil 24’de de gösterildiği üzere  $m/z$  651 iyonu her üç spektrumda ortak olan iyonudur. Bu iyonun gaz-fazındaki yapısını aydınlatılabilmek için MS<sup>4</sup> ( $MH^+ \rightarrow b_7 \rightarrow 651$ ) deneyleri her üç peptit için ayrı ayrı iyon-trap kütle spektrometresinde yapılmıştır. CID kütle spektrumlarına bakıldığında, bu her üç peptitten elde edilen  $m/z$  651 iyonlarının gaz-fazındaki parçalanma yolları ve ürünleri birbirlerinin tamamen aynısıdır (Şekil 24); bu da göstermektedir ki, N-ucu asetillenmiş olan lizin, glutamin ve asparajinin  $b_7$  iyonundan nötral olarak kopup YAGFLV<sub>oxa</sub> iyon yapısını yüklü bir şekilde bıraktığı düşünülmüştür. Bu önerdiğimiz mekanizmanın doğru olup olmadığı kontrol etmek için YAGFLV-NH<sub>2</sub> peptiti satın alınıp  $b_6$  ( $m/z$  651) CID kütle spektrumu alınmıştır. Şekil 24’ün son kısmında gösterilen  $b_6$  ( $m/z$  651) iyonun kütle spektrumu ile N-ucu asetillenmiş lizin, glutamin ve asparajin içeren peptitlerden elde edilen  $m/z$  651 iyonunun gaz-fazındaki parçalanma yolları ve ürünleri birbirlerinin tamamen aynısıdır. Bu durum öngördüğümüz mekanizmayı desteklemektedir.



Şekil 24. Ac-KYAGFLVG-OH, Ac-QYAGFLV-NH<sub>2</sub>, Ac-NYAGFLV-NH<sub>2</sub> peptitlerin *b*<sub>7</sub> iyonlarından elde edilen *m/z* 651 iyonun ve YAGFLV-NH<sub>2</sub> peptitinden elde edilen *b*<sub>6</sub> (*m/z* 651) iyonun kütle spektumunun karşılaştırılması

Lizin amino asitinin yan zincirindeki *ε-amin* grubunun N-ucu asetillenmiş peptitlerde makrosiklik *b* iyon yapısına olan etkisi olduğu görüldükten sonra çalışmanın ikinci kısmında N-ucu asetillenmiş peptitlerdeki lizinin pozisyonu değiştirilmesinin makrosiklik *b* iyon yapısına muhtemel etkisi araştırılmak istenmiştir. Bu sebeple altı tane birbirinin izomeri olan

oktapeptitler tasarlanmıştır: Ac-KYAGFLVG-OH, Ac-YKAGFLVG-OH, Ac-YAKGFLVG-OH, Ac-YAGKFLVG-OH, Ac-YAGFKLVG-OH ve Ac-YAGFLKVG-OH. Model peptitlerin dizilim sırasında da görüleceği üzere lizin amino asitinin pozisyonu 1.' den 6.' ya kadar değişmektedir. Böylece lizin pozisyonun direk olmayan *b* iyonlarına olan etkisi araştırılmış olacaktır. Bu altı peptidin iyon-trap kütle spektrometre cihazında *b*<sub>7</sub> iyonlarının CID kütle spektrumu alınmıştır (Şekil 25). Şekil 25'de de açıkça görülmektedir ki makrosiklik yapıdan dolayı oluşan direk olmayan *b* iyonlarının şiddeti lizin amino asitinin peptitte iç pozisyonlara hareket etmesi ile azalmaktadır. En yüksek oranda direk olmayan *b* iyonları sadece Ac-KYAGFLVG model peptitinde görülmektedir.



Şekil 25. Ac-KYAGFLVG-OH, Ac-YKAGFLVG-OH, Ac-YAKGFLVG-OH, Ac-YAGKFLVG-OH, Ac-YAGFKLVG-OH ve Ac-YAGFLKVG-OH peptit türevlerinden izole edilen *b*<sub>7</sub> iyonların kütle spektrumunun karşılaştırılması



### 3.4. Sekansında Hidroksil Grubu İhtiva Eden Peptit Türevleri

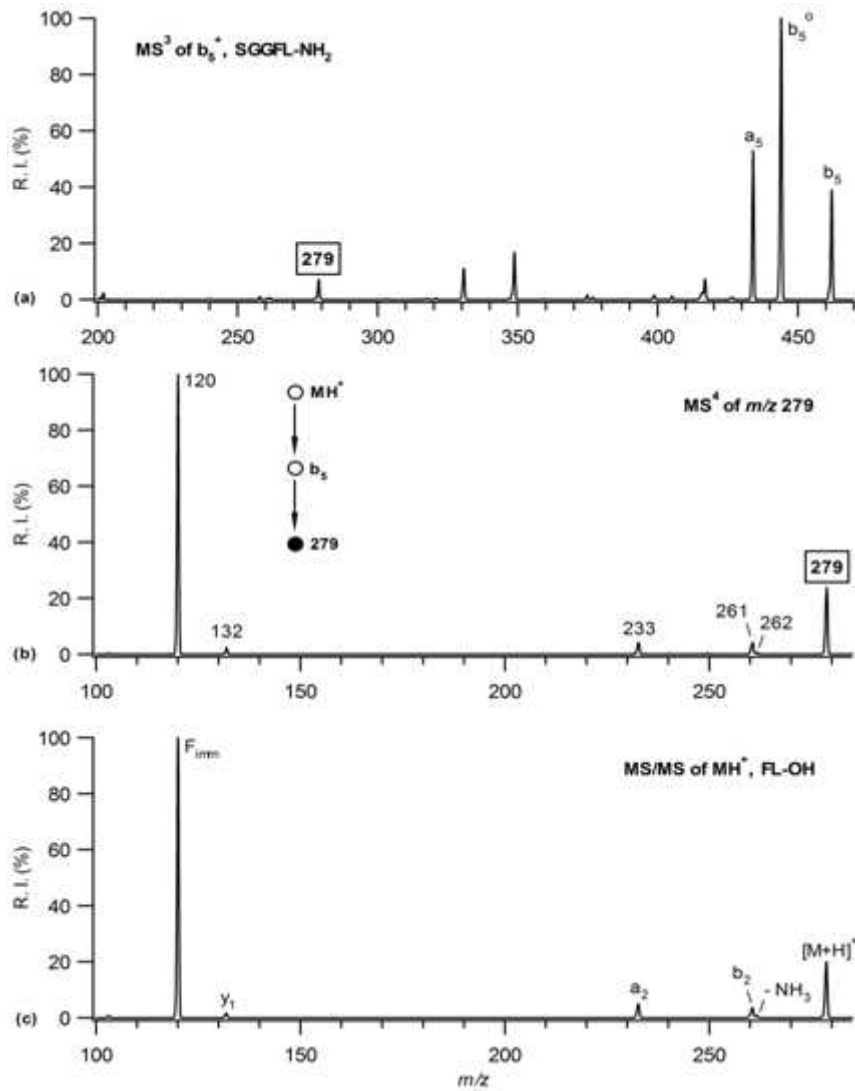
Bu çalışmada yan zincirlerinde hidroksil grubu (-OH) bulunan amino asitlerden serin, S; treonin, T; glutamik asit, E; aspartik asit, D ve tirozin, Y, iki değişik grup penta peptit serileri ile çalışılmıştır. Birinci gruptaki peptitlerin ilk pozisyonlarında yan zincirlerinde hidroksil grubu içeren amino asitler bulunmaktadır ve model pentapeptitler şu şekildedir: SGGFL-NH<sub>2</sub>, TGGFL-NH<sub>2</sub>, EGGFL-NH<sub>2</sub>, DGGFL-NH<sub>2</sub>, YGGFL-NH<sub>2</sub> (G:glisin, F: fenilalanin ve L: lösin amino asitini göstermektedir). Diğer yandan ikinci gruptaki peptitlerde ise hidroksil grubu ihtiva eden amino asitlerin pozisyonu ikinci konuma kaydırılmış ve model peptitin amino asit içeriği değiştirilmiştir. İkinci gruptaki model peptitler de şu şekilde sıralanmaktadır; ASVYI-NH<sub>2</sub>, ATVYI-NH<sub>2</sub>, AEVYI-NH<sub>2</sub>, ADVYI-NH<sub>2</sub>, AYVYI-NH<sub>2</sub> (A: alanin, V: valin ve I:izolösin amino asitini belirtmektedir). Proje kapsamında bu her iki peptit grubundan elde edilen **b<sub>5</sub>** ve **b<sub>4</sub>** iyonlarının CID (çarpışmalı-indüklenmiş ayrışma) kütle spektrumlarında gözlenen karakteristik parçalanma ürünlerinin yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

XGGFL-NH<sub>2</sub> (X harfi S, T, E, D veya Y amino asitini göstermektedir) model peptitlerinden izole edilen **b<sub>5</sub>** iyonlarının CID kütle spektrumları dikkatle incelendiğinde ortak *m/z* 279 parçalanma iyonunun varlığı gözlemlenmiştir. Yine aynı peptit serisinin **b<sub>4</sub>** iyonlarının CID kütle spektrumlarında ise ortak *m/z* 223 parçalanma iyonunun var olduğu (YGGFL-NH<sub>2</sub> peptitinden elde edilen **b<sub>4</sub>** iyonunun kütle spektrumu hariç) açıkça görülmüştür. Diğer yandan, AXVYI-NH<sub>2</sub> (X harfi yine S, T, E, D veya Y amino asitini göstermektedir) model peptitlerden elde edilen **b<sub>5</sub>** iyonlarının CID kütle spektrumlarına bakıldığında ortak *m/z* 295 parçalanma iyonunun ve **b<sub>4</sub>** iyonlarının CID kütle spektrumlarında ise *m/z* 281 parçalanma iyonunun varlığı (AYVYI-NH<sub>2</sub> peptitinden elde edilen **b<sub>4</sub>** iyonunun kütle spektrumu hariç) gözlemlenmiştir.

#### 3.4.1. XGGFL-NH<sub>2</sub> Peptit Serisinden Elde Edilen **b<sub>5</sub>** ve **b<sub>4</sub>** İyonlarındaki Dipeptit Kopmaları

Gaz fazında protonlanan peptitin [M+H]<sup>+</sup> iyonunun NH<sub>3</sub> kaybetmesi ile **b<sub>5</sub>** iyonu oluşmaktadır. Benzer bir şekilde **b<sub>5</sub>** iyonunun C-ucundaki aminoasitin kopması ile de **b<sub>4</sub>** iyonu oluşmaktadır. Birinci gruptaki pentapeptitlerin **b<sub>5</sub>** kütle spektrumları karşılaştırıldığında *m/z* 295 iyonunun varlığı ve **b<sub>4</sub>** iyonlarının kütle spektrumları karşılaştırıldığında ise *m/z* 223

iyonun var olduğu (YGGFL-NH<sub>2</sub> peptidinin *b*<sub>4</sub> kütle spektrumu haricinde) gözlemlenmiştir. Ortak olarak görülen bu her iki iyonun yapısını aydınlatılabilmesi için MS<sup>4</sup> (MS/MS/MS/MS) deneyleri her bir iyon için ayrı ayrı yapılmıştır. Detaylı bir şekilde yürütülen ardışık kütle spektrometre (tandem MS) deneyleri sonucunda *m/z* 279 iyonun FL-OH, *m/z* 233 iyonunun ise GF-OH olduğu kanıtlanmıştır. Şekil 26 ve 27’de birinci gruptan seçilen iki pentapeptide ait örnek kütle spektrumları gösterilmiştir. Tablo 1’de ise bu model peptitlerinden elde edilen *b*<sub>5</sub> iyonlarının CID kütle spektrumlarında ortak var olan *m/z* 279 iyonunun bağıl şiddetleri ve *b*<sub>4</sub> iyonlarında ortak var olan *m/z* 223 iyonunun bağıl şiddetleri listelenmiştir.

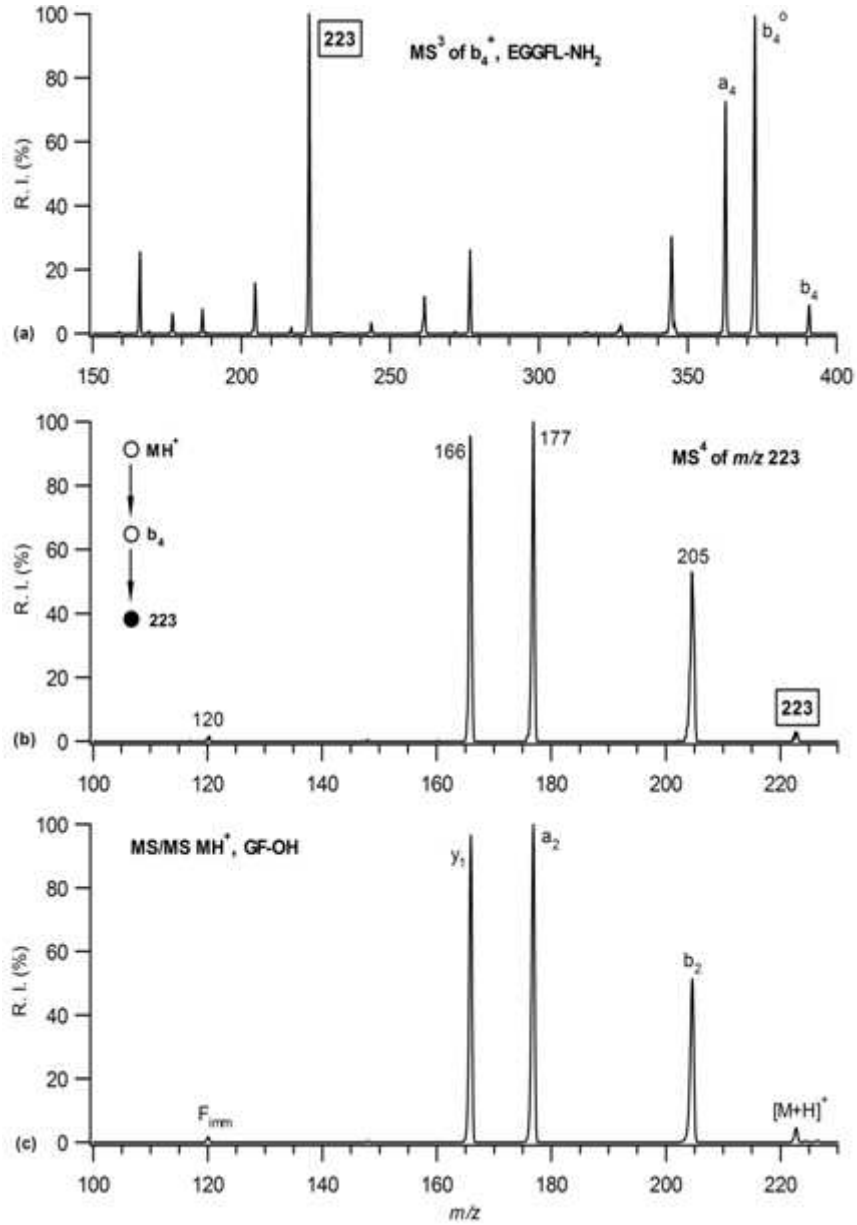


Şekil 26. (a) SGGFL-NH<sub>2</sub> model peptidinden izole edilen *b*<sub>5</sub> iyonunun MS<sup>3</sup> kütle spektrumu, (b) *b*<sub>5</sub> iyonunun parçalanması sonucunda oluşan *m/z* 279 iyonunun MS<sup>4</sup> kütle spektrumu, (c) FL-OH dipeptidinin [M+H]<sup>+</sup> MS<sup>2</sup> kütle spektrumu

Örnek olarak, şekil 26a’da SGGFL-NH<sub>2</sub> peptitinden elde edilen **b**<sub>5</sub> iyonunun (*m/z* 462) CID kütle spektrumu gösterilmiştir. Bu peptitin **b**<sub>5</sub> CID kütle spektrumundaki *m/z* 279 iyonunun bağıl şiddeti % 7.23 olarak tespit edilmiştir. Bu iyonun gaz-fazı yapısı ve parçalanma mekanizmasını araştırabilmek için *m/z* 279 iyonu seçilip (MS<sup>4</sup>, MH<sup>+</sup> → **b**<sub>5</sub> → 279) gaz fazında helyum gazı ile çarpıştırılarak parçalanması sağlanmıştır. *m/z* 279’un parçalanmasından elde edilen kütle spektrumu Şekil 26b’de gösterilmiştir. Şekil 26b’de görüldüğü gibi *m/z* 120’deki iyon spektrumdaki en yüksek şiddetteki iyondur. Fenilalanin amino asitinin imonyum iyonunun kütlelerine denk gelen bu değer *m/z* 279 iyonunun yapısında fenil alanin amino asitinin varlığı göstermiştir. *m/z* 279 iyonunun yapısının FL (fenilalanin ve lösin) dipeptiti olduğu varsayılmıştır. Bunu doğrulamak için FL-OH dipeptiti satın alınmıştır ve [M+H]<sup>+</sup> iyonunun MS/MS kütle spektrumu alınmıştır (Şekil 26c). Şekil 26b ve c karşılaştırıldığında her iki spektrumun da aynı iyonlara ve aynı bağıl şiddetlerine sahip olduğu açıkça görülmüştür. Böylece gaz fazındaki **b**<sub>5</sub> iyonun parçalanması sırasında peptitin C-ucundaki iki tane amino asitin protonlanmış bir şekilde dipeptit olarak (FL-OH) koştugu doğrulanmış olmaktadır. Diğer peptitlerin **b**<sub>5</sub> iyonlarının CID kütle spektrumlarında gözlemlenen *m/z* 279 iyonlarına ait MS<sup>4</sup> CID kütle spektrumları Şekil 28’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** XGGFL-NH<sub>2</sub> model peptitlerinden elde edilen **b**<sub>5</sub> iyonlarında ortak var olan *m/z* 279 iyonunun bağıl şiddetleri ve **b**<sub>4</sub> iyonlarında ortak var olan *m/z* 223 iyonunun bağıl şiddetleri

<i>m/z</i> 279		<i>m/z</i> 223	
peptit	% iyon şiddeti	peptit	% iyon şiddeti
SGGFL-NH <sub>2</sub>	7.23	SGGFL-NH <sub>2</sub>	0.488
TGGFL-NH <sub>2</sub>	10.3	TGGFL-NH <sub>2</sub>	0.440
EGGFL-NH <sub>2</sub>	0.586	EGGFL-NH <sub>2</sub>	100
DGGFL-NH <sub>2</sub>	0.266	DGGFL-NH <sub>2</sub>	0.852
YGGFL-NH <sub>2</sub>	0.00659		

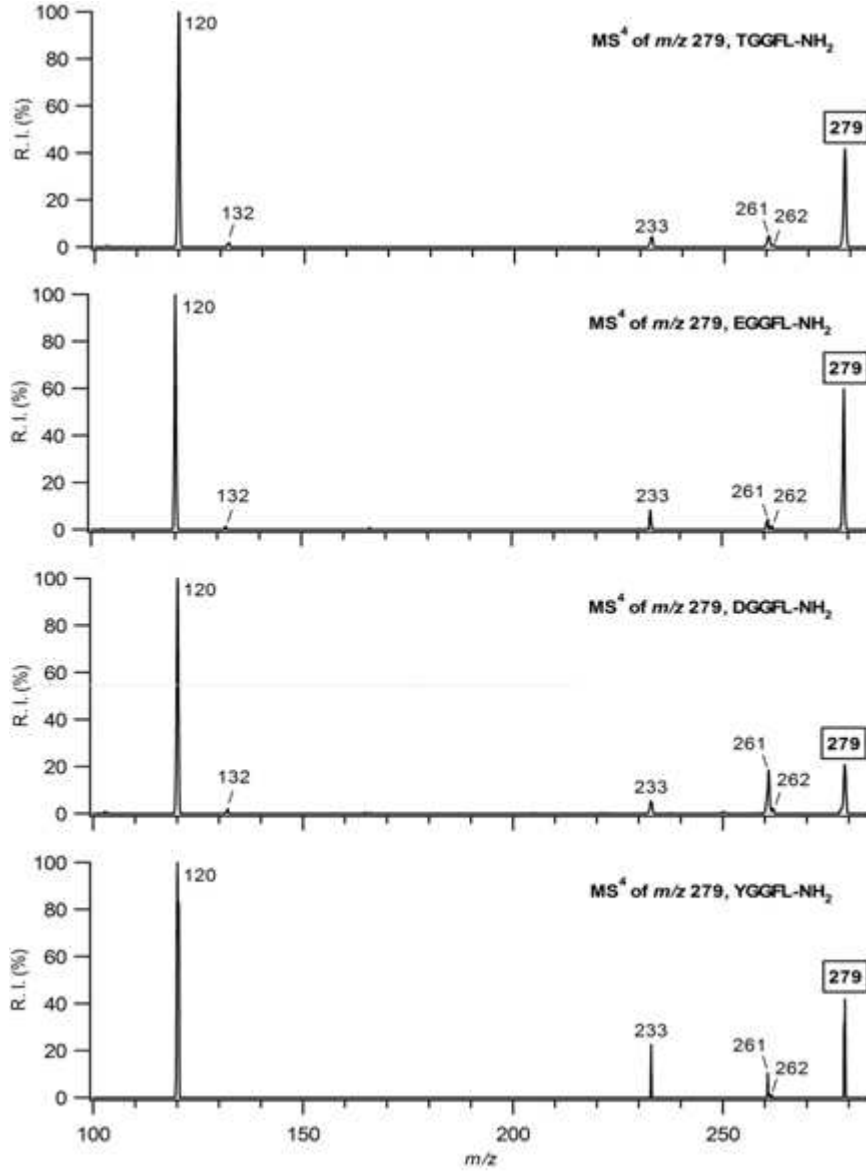


**Şekil 27.** (a) EGGFL-NH<sub>2</sub> model peptitinden izole edilen  $b_4$  iyonunun  $MS^3$  kütle spektrumu, (b)  $b_4$  iyonunun parçalanması sonucunda oluşan  $m/z$  223 iyonunun  $MS^4$  kütle spektrumu, (c) GF-OH dipeptinin  $[M+H]^+$   $MS^2$  kütle spektrumu

Diğer yandan, EGGFL-NH<sub>2</sub> pentapeptitin  $b_4$  CID kütle spektrumunda görülen  $m/z$  223 iyonu (Şekil 27a)  $MS^4$  deneyi ile seçilip gaz fazında parçalanması sağlanmıştır. Benzer bir şekilde GF-OH (glisin ve fenilalanin içeren dipeptit) olarak sentezlenen dipeptitin  $[M+H]^+$  kütle spektrumu ile  $m/z$  223'ün  $MS^4$  kütle spektrumu birbirlerinin tamamen aynı olduğu gösterilmiştir (Şekil 27b ve c). Diğer peptitlerin  $b_4$  iyonlarının CID kütle spektrumlarında gözlemlenen  $m/z$  223 iyonlarına ait  $MS^4$  CID kütle spektrumları Şekil 29'da gösterilmiştir.

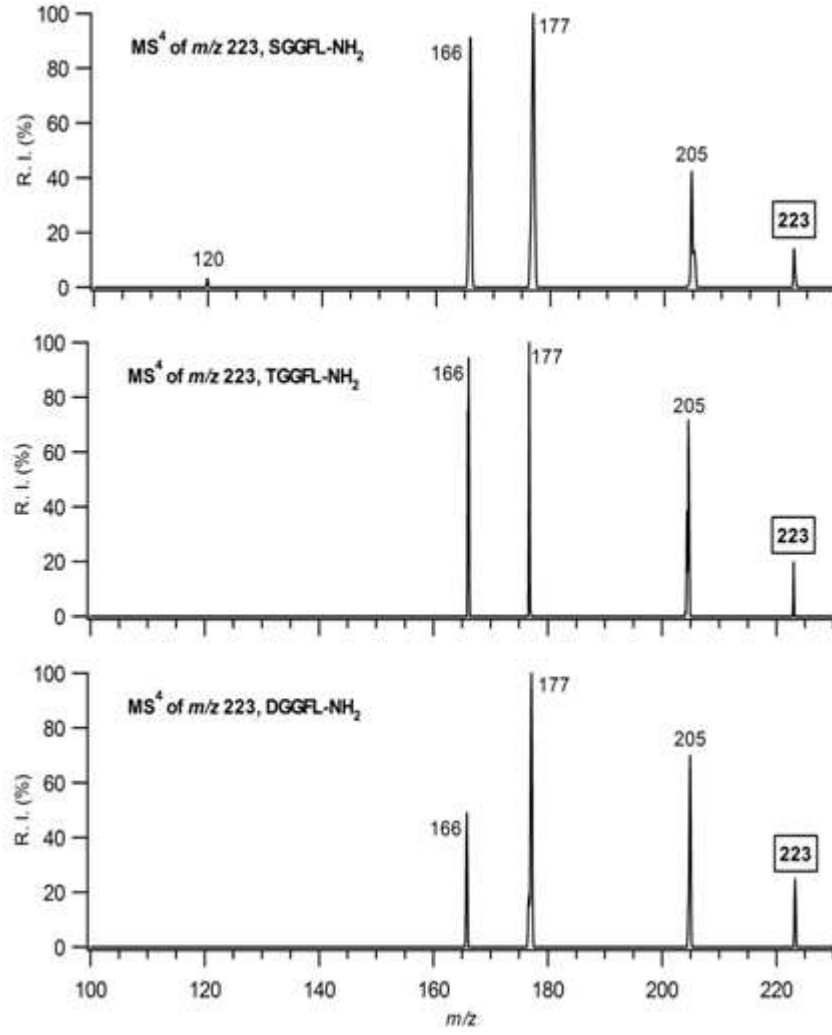
Hem  $b_5$  hem de  $b_4$ 'ten kopan protonlanmış dipeptitlerin peptitlerdeki sıraya göre koptuğu da bu şekilde gösterilmiş olmaktadır. Dipeptitlerin amino asit dizilerinin LF veya FG

olmadığı da bu peptitlerin satın alımıp  $[M+H]^+$  kütle spektrumlarının karşılaştırılması ile kanıtlanmıştır. Bu dipeptitlerin kütle spektrumları Şekil 30'da gösterilmiştir.

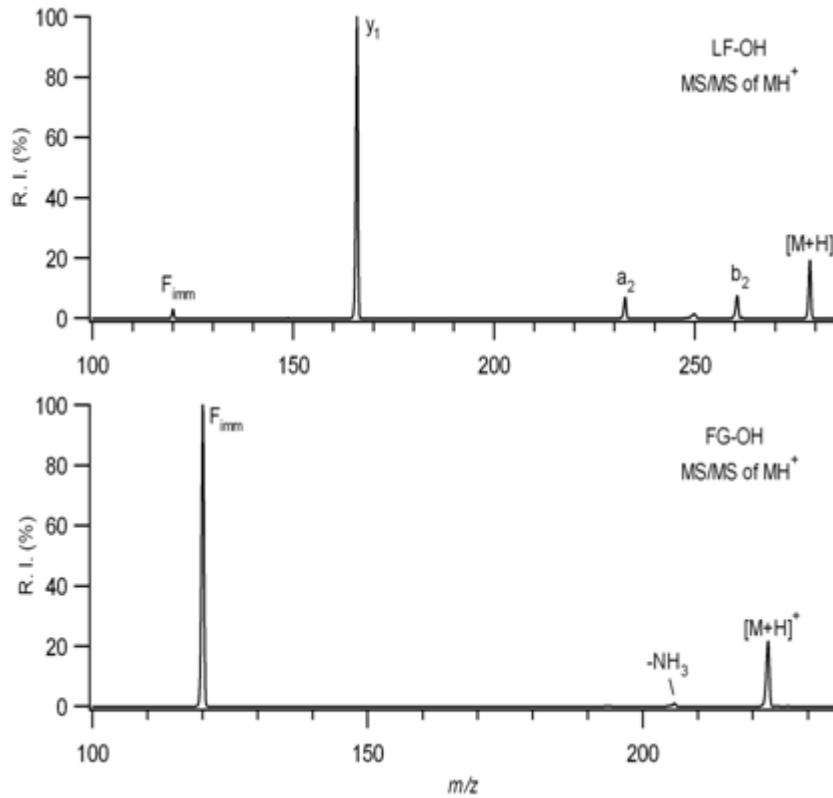


Şekil 28. XGGFL-NH<sub>2</sub> (X: T, E, D ve Y) peptit serisinden elde edilen **b**<sub>5</sub> iyonlarının parçalanması sonucunda oluşan  $m/z$  279 iyonlarının MS<sup>4</sup> CID kütle spektrumları

YGGFL-NH<sub>2</sub>'nin **b**<sub>4</sub> iyonunun CID kütle spektrumunda  $m/z$  223 iyonu saptanmamıştır. Tirozin amino asitinin yan zincirinde bulunan büyük grubun dipeptit kopma reaksiyonuna engel olduğu düşünülmektedir. Bu durum **b**<sub>5</sub> iyonunda da çok düşük şiddette  $m/z$  279 iyonunun görülmesine neden olmuştur.



Şekil 29. XGGFL-NH<sub>2</sub> (X: S, T ve D) peptit serisinden elde edilen *b*<sub>4</sub> iyonlarının parçalanması sonucunda oluşan m/z 223 iyonlarının MS<sup>4</sup> CID kütle spektrumları



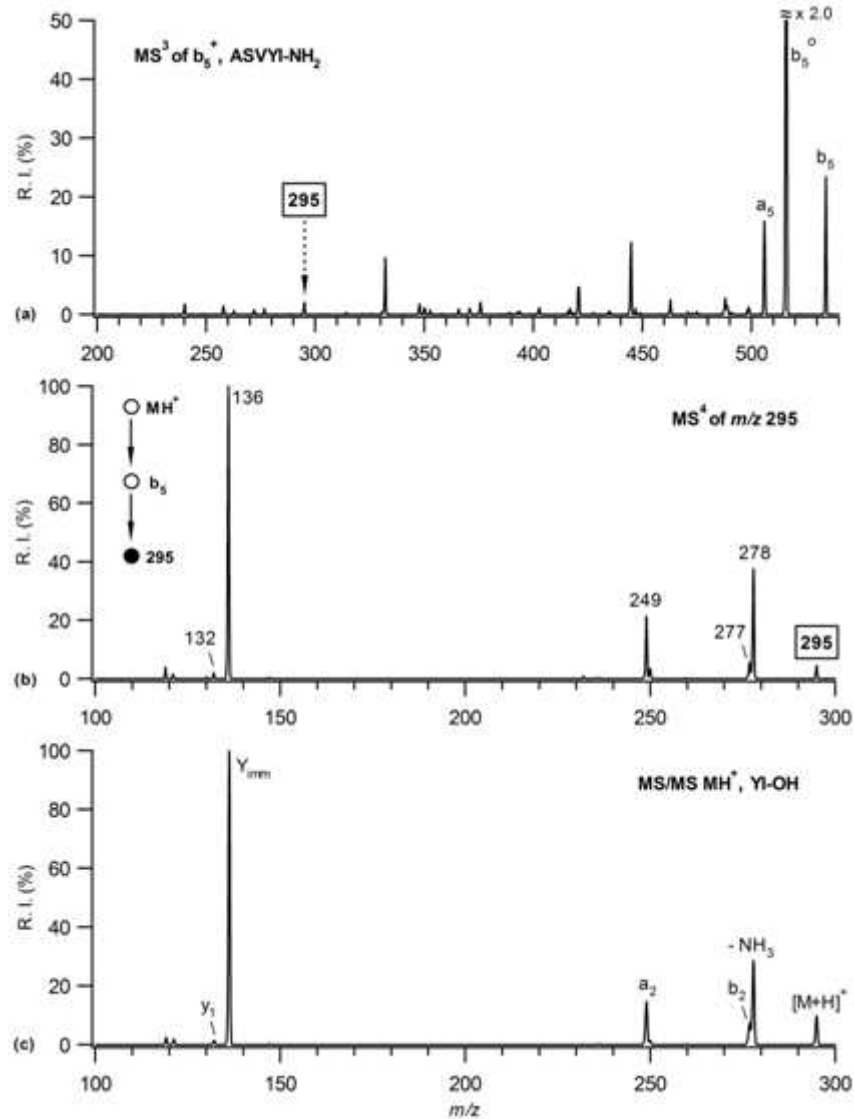
Şekil 30. LF-OH ve FG-OH dipeptilerinin  $[M+H]^+$  MS/MS kütle spektrumları

### 3.4.2. AXVYI-NH<sub>2</sub> Peptit Serisinden Elde Edilen $b_5$ ve $b_4$ İyonlarındaki Dipeptit Kopmaları

İkinci gruptaki pentapeptitlerde de yine benzer bir şekilde  $b_5$  CID kütle spektrumları karşılaştırıldığında  $m/z$  295 iyonunun varlığı ve  $b_4$  iyonlarının CID kütle spektrumları karşılaştırıldığında ise  $m/z$  281 iyonun var olduğu (AYVYI-NH<sub>2</sub> peptitinin  $b_4$  kütle spektrumu haricinde) gözlemlenmiştir. MS<sup>4</sup> deneyleri yapılarak bu her iki iyonu hangi aminoasitlerden oluştuğu araştırılmıştır. Deneyler sonucunda  $m/z$  279'un YI-OH ve  $m/z$  281'in ise de VY-OH olduğu gösterilmiştir. Tablo 2'de bu gruptaki model peptitlerinden elde edilen  $b_5$  iyonlarının CID kütle spektrumlarında ortak var olan  $m/z$  295 iyonunun bağıl şiddetleri ve  $b_4$  iyonlarında ortak var olan  $m/z$  223 iyonunun bağıl şiddetleri listelenmiştir.

Örnek olarak, Şekil 31a'da ASVYI-NH<sub>2</sub> peptidine ait  $b_5$  iyonunun ( $m/z$  534) CID kütle spektrumu gösterilmiştir. Bu peptitin  $b_5$  CID kütle spektrumundaki  $m/z$  295 iyonunun bağıl şiddeti % 2.04 olarak saptanmıştır. Bu iyonun gaz-fazı yapısı ve parçalanma mekanizmasını araştırabilmek için  $m/z$  295 iyonu seçilip (MS<sup>4</sup>,  $MH^+ \rightarrow b_5 \rightarrow 295$ ) gaz fazında helyum

parçalanması sağlanmıştır.  $m/z$  295'in parçalanmasından elde edilen kütle spektrumu Şekil 31'de gösterilmiştir. Birinci gruptaki peptitlerdeki kopmalar benzer şekilde  $m/z$  295 iyonunun yapısının YI (trozin ve izolösin) dipeptiti olduğu düşünülmüştür. Bunu doğrulamak için YI-OH dipeptiti satın alınmıştır ve  $[M+H]^+$  iyonunun MS/MS kütle spektrumu alınmıştır (Şekil 31c). Şekil 31b ve c karşılaştırıldığında her iki spektrumun da aynı iyonlara ve aynı bağıl şiddetlerine sahip olduğu açıkça görülmüştür. Böylece gaz fazındaki  $b_5$  iyonunun parçalanması sırasında peptitin C-ucundaki iki tane amino asitin protonlanmış bir şekilde dipeptit olarak (YI-OH) koptuğu doğrulanmış olmaktadır. Diğer peptitlerin  $b_5$  iyonlarının CID kütle spektrumlarında gözlemlenen  $m/z$  295 iyonlarına ait MS<sup>4</sup> CID kütle spektrumları Şekil 32'de gösterilmiştir.

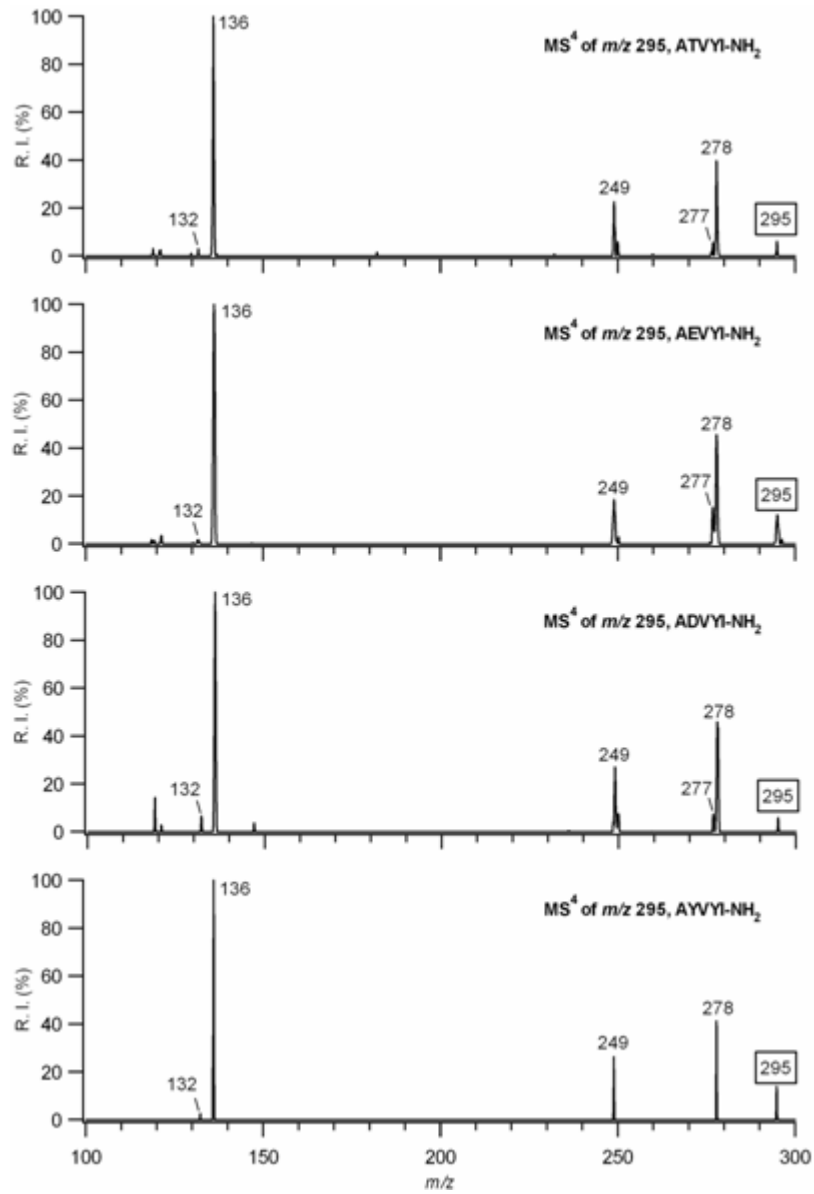


**Şekil 31.** (a) ASVYI-NH<sub>2</sub> model peptitinden izole edilen  $b_5$  iyonunun MS<sup>3</sup> kütle spektrumu, (b)  $b_5$  iyonunun parçalanması sonucunda oluşan  $m/z$  295 iyonunun MS<sup>4</sup> kütle spektrumu, (c) YI-OH dipeptitinin  $[M+H]^+$  MS<sup>2</sup> kütle spektrumu



**Tablo 2.** AXVYI-NH<sub>2</sub> model peptitlerinden elde edilen *b*<sub>5</sub> iyonlarında ortak var olan *m/z* 295 iyonunun bağıl şiddetleri ve *b*<sub>4</sub> iyonlarında ortak var olan *m/z* 281 iyonunun bağıl şiddetleri

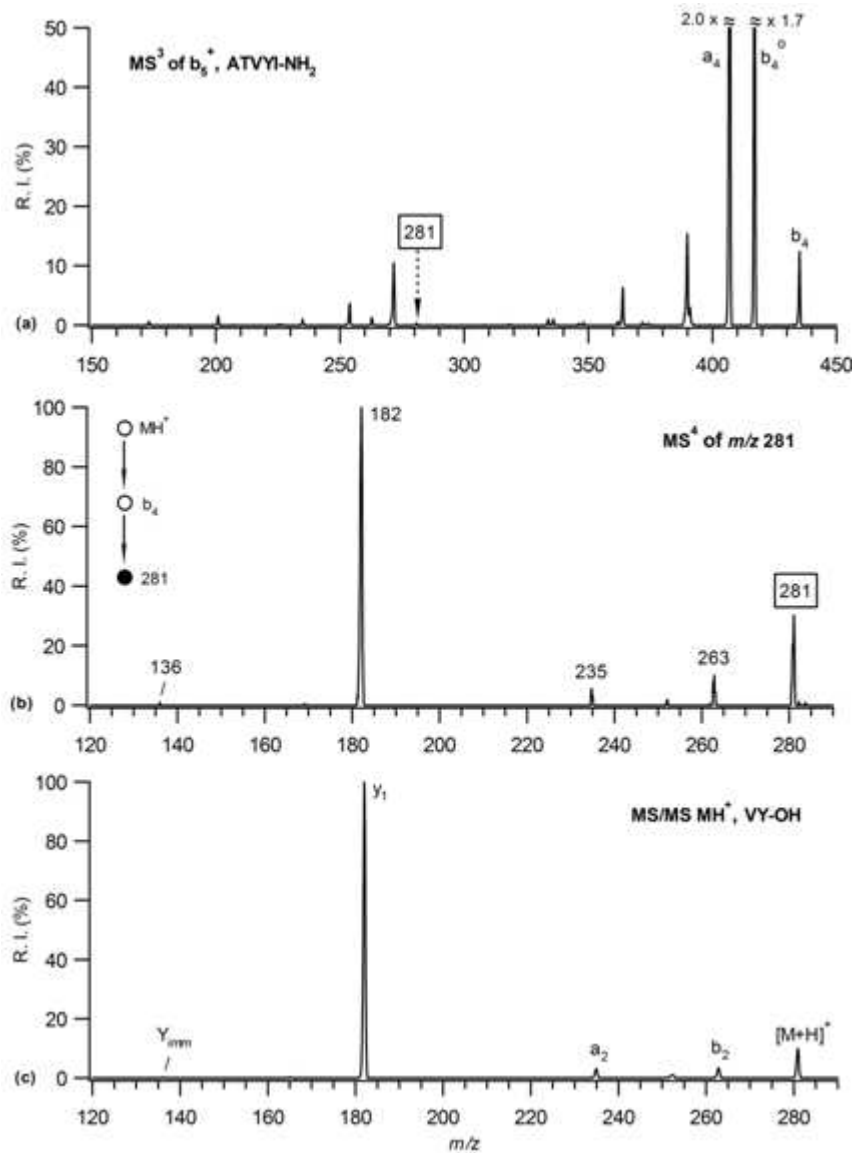
<i>m/z</i> 295		<i>m/z</i> 281	
peptit	% iyon şiddeti	peptit	% iyon şiddeti
ASVYI-NH <sub>2</sub>	2.04	ASVYI-NH <sub>2</sub>	0.818
ATVYI-NH <sub>2</sub>	0.173	ATVYI-NH <sub>2</sub>	0.384
AEVYI-NH <sub>2</sub>	0.0795	AEVYI-NH <sub>2</sub>	0.234
AYVYI-NH <sub>2</sub>	0.0184		



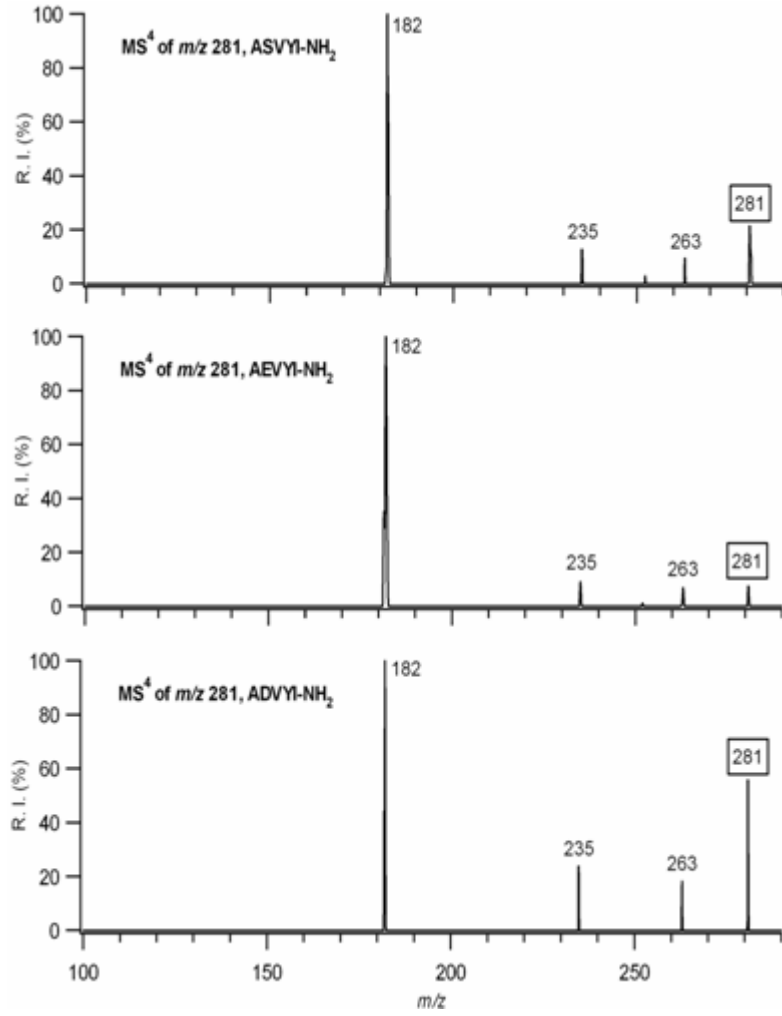
**Şekil 32.** AXVYI-NH<sub>2</sub> (X: T, E, D ve Y) peptit serisinden elde edilen *b*<sub>5</sub> iyonlarının parçalanması sonucunda oluşan *m/z* 295 iyonlarının MS<sup>4</sup> CID kütle spektrumları

ATVYI-NH<sub>2</sub> pentapeptitin *b*<sub>4</sub> CID kütle spektrumunda görülen *m/z* 281 iyonu (Şekil 33a) MS<sup>4</sup> deneyi ile seçilip gaz fazında parçalanması sağlanmıştır. Benzer bir şekilde VY-OH (Valin ve Trizon içeren dipeptit) olarak sentezlenen dipeptitin [M+H]<sup>+</sup> kütle spektrumu ile *m/z* 281'in MS<sup>4</sup> kütle spektrumu birbirlerinin tamamen aynı olduğu gösterilmiştir (Şekil 33b ve c). Diğer peptitlerin *b*<sub>4</sub> iyonlarının CID kütle spektrumlarında gözlemlenen *m/z* 281 iyonlarına ait MS<sup>4</sup> CID kütle spektrumları Şekil 34 de gösterilmiştir.

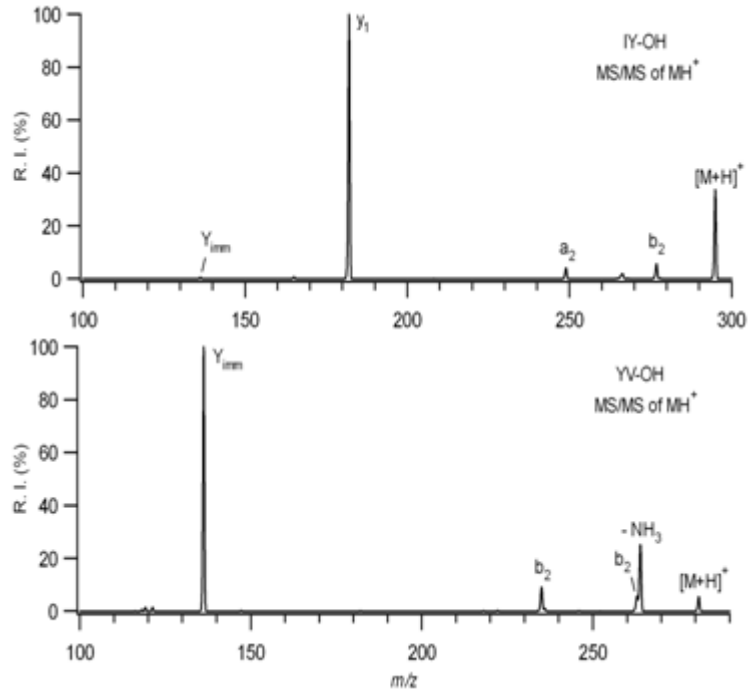
Protonlanmış olarak kopan dipeptitlerin amino asit dizilerinin IY-OH veya YV-OH olmadığı da bu peptitlerin satın alınıp [M+H]<sup>+</sup> kütle spektrumlarını karşılaştırılması ile kanıtlanmıştır. Bu dipeptitlerin kütle spektrumları Şekil 35'de gösterilmiştir.



**Şekil 33** ATVYI-NH<sub>2</sub> model peptitinden izole edilen *b*<sub>5</sub> iyonunun MS<sup>3</sup> kütle spektrumu, (b) *b*<sub>4</sub> iyonunun parçalanması sonucunda oluşan *m/z* 281 iyonunun MS<sup>4</sup> kütle spektrumu, (c) VY-OH dipeptitinin [M+H]<sup>+</sup> MS<sup>2</sup> kütle spektrumu



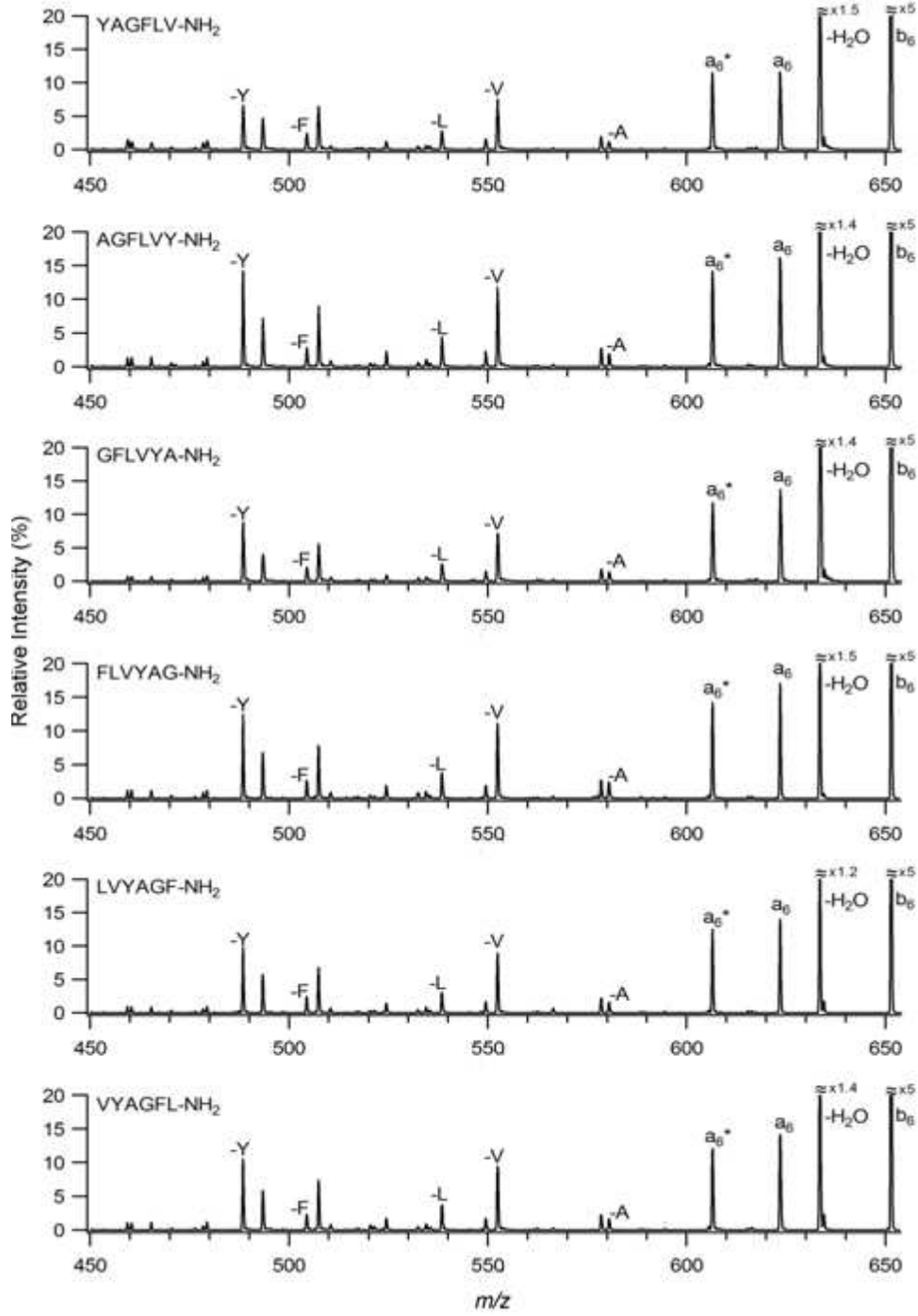
Şekil 34. AXVYI-NH<sub>2</sub> (X: S, E ve D) peptit serisinden elde edilen  $b_4$  iyonlarının parçalanması sonucunda oluşan  $m/z$  281 iyonlarının MS<sup>4</sup> CID kütle spektrumları



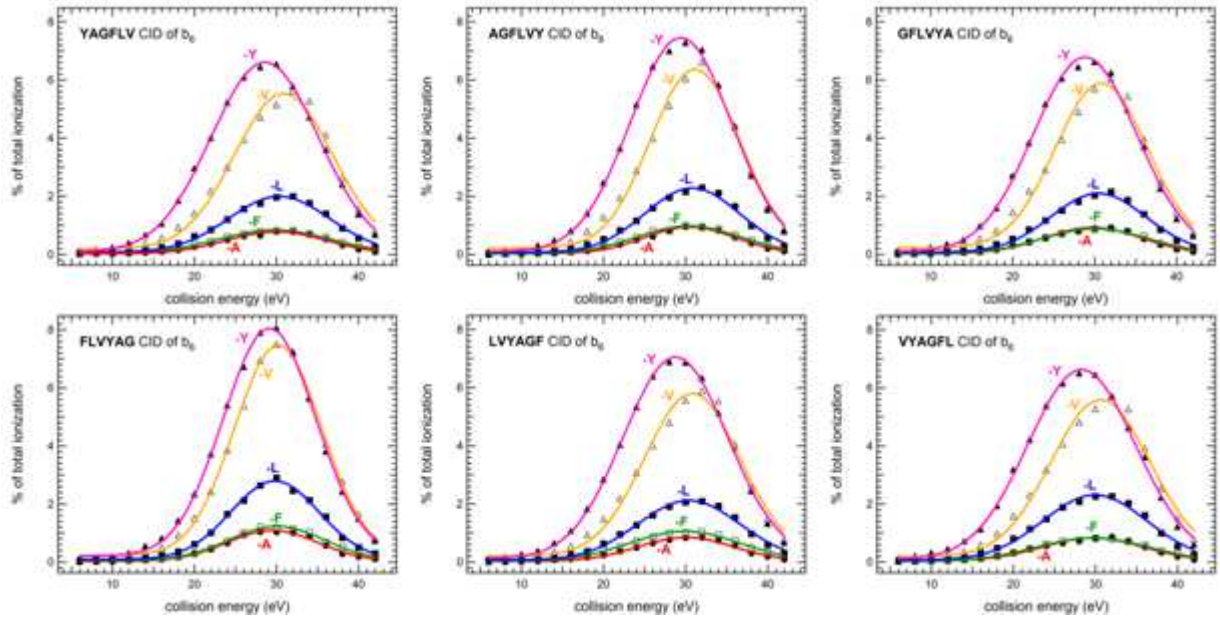
Şekil 35. IY-OH ve YV-OH dipeptilerinin [M+H]<sup>+</sup> MS/MS kütle spektrumları

### *3.5 Peptit Büyüklüğü, pozisyon, komşu amino asit ve yan zincir etkileri*

Bu çalışmada ise amino asitin yan zincirinin, peptit uzunluğunun, amino asitin peptit içindeki pozisyonunun ve komşu amino asitin makrosiklik yapının oluşmasına olan etkileri araştırılmıştır. Çalışma sırasında kullanılan peptitler şöyledir: YAGFLV-NH<sub>2</sub>, AGFLVY-NH<sub>2</sub>, GFLVYA-NH<sub>2</sub>, FLVYAG-NH<sub>2</sub>, LUYAGF-NH<sub>2</sub> ve VYAGFL-NH<sub>2</sub>. Bu peptitlerden elde edilen **b**<sub>6</sub> iyonlarının kütle spektrumları ve **b**<sub>6</sub> iyonlarından tek amino asit kopmalarının enerjiye bağlı olarak kopma profilleri birbirlerinin aynısıdır (Şekil 36 ve 37). Bu sonuçlar makrosiklik yapının oluştuğunun ve bu peptit türevleri birbirlerinin izomeri olduğu için makrosiklik yapının oluşmasında herhangi bir etkisinin olmadığı açıkça göstermiştir.

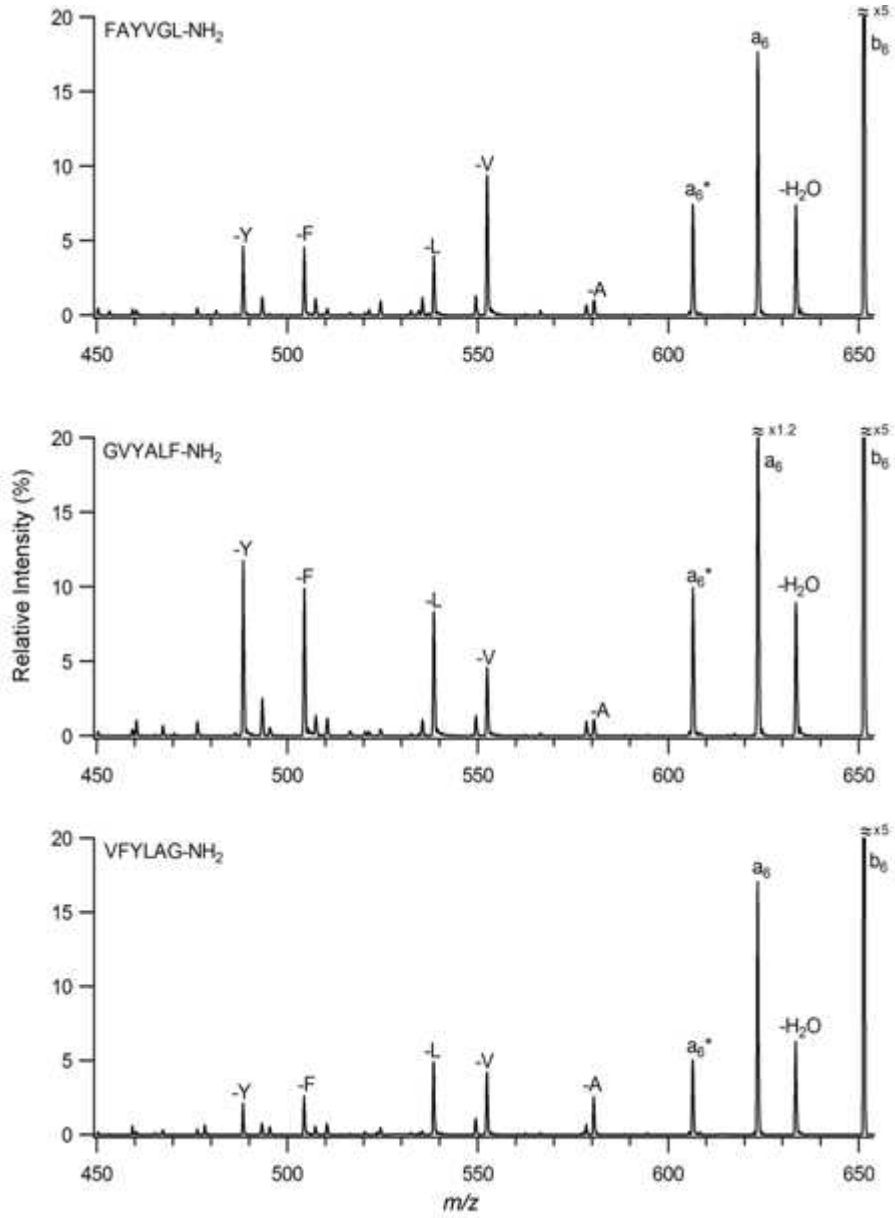


Şekil 36. Değişik peptit türevlerinden elde edilen  $b_6$  iyonlarının MS/MS kütle spektrumları

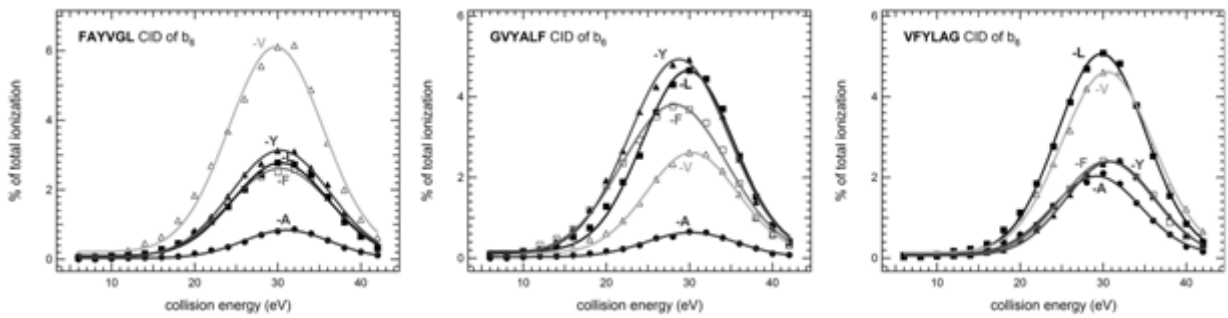


Şekil 37. Değişik peptit türevlerinden elde edilen  $b_6$  iyonlarının iyon şiddetlerinin enerjiye bağlı grafiksel değişim profilleri.

Diğer yandan  $FAYVGL-NH_2$ ,  $GVYALF-NH_2$  and  $VFYLAG-NH_2$  model peptitleri kullanılarak yapılan çalışmada ise amino asit dizilimleri farklı olduğu için hem  $b_6$  iyonlarının kütle spektrumları, hemde “breakdown” grafikleri farklılık göstermektedir. Bu sonuçlar komşu amino asitin makrosiklik yapının açılma yollarına etkisinin olduğunu açıkça göstermiştir. Şekil 38 de gösterilen MS/MS kütle spektrumları birbirinin benzeridir ama 100% aynısı değildir. Bunun yanında  $b_6$  iyonlarından tek amino asit kopmalarının enerjiye bağlı olarak kopma profilleri birbirlerinin aynısı da değildir. Bunun sebebi açıkça görülmektedir. Makrosiklik yapı oluştuğunda yukarıda listelenen peptit türevleri aynı sekansa sahip olmaktadır. Açık olarak farklı sekans yapıya sahipmiş gibi görünselerde, makrosiklik yapı oluşum sırasında bütün izomerik peptit türevleri aynı siklik yapıya dönüşmekte ve dolayısı ile aynı yapıya sahip olan iyonlarda benzer koşullar altında aynı davranışı gösteririler. Yani makrosiklik yapının açılım pozisyonları ve oluşan iyonların sinyaller şiddetleri ve enerjiye bağlı kopma profilleride aynı olmalıdır ve deneysel sonuçlar bunu desteklemektedir. Fakat daha sonraki peptit türevleri yukarıdaki peptit türevleri ile izomer oldukları halde makrosiklik yapı oluştuğunda farklı sekans dizilimine sahip olmaktadır ve buda bu iyonların farklı davranış göstereceği yönündedir. Deneysel sonuçlar bu tahminizi doğrulamaktadır. Sonuçlar Şekil 38 ve 39 da detaylı bir şekilde gösterilmektedir.



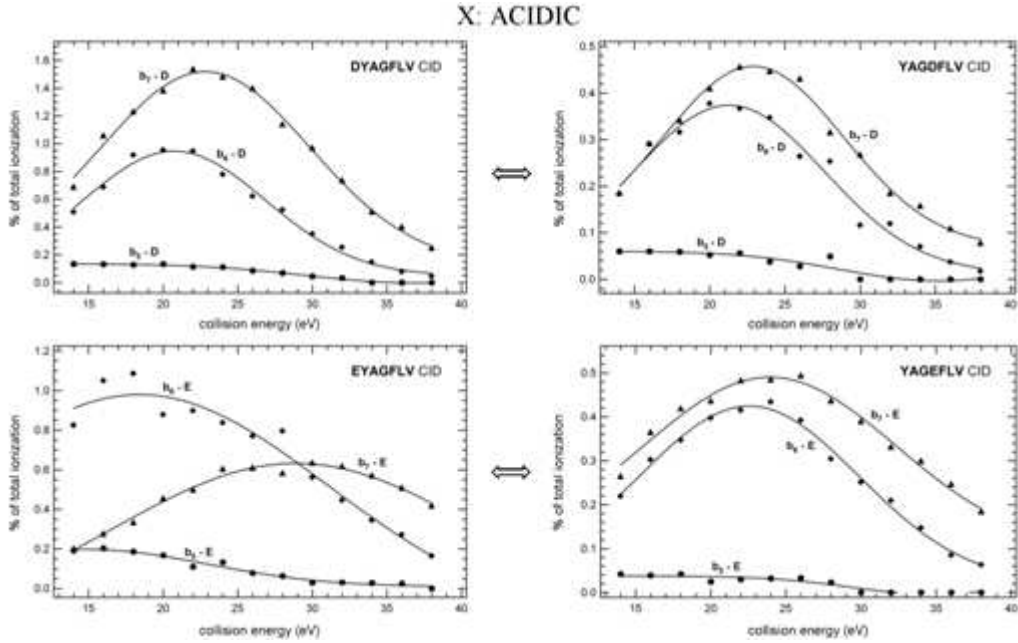
Şekil 38. Değişik peptit türevlerinden elde edilen  $b_6$  iyonlarının MS/MS Kütle spektrumu.



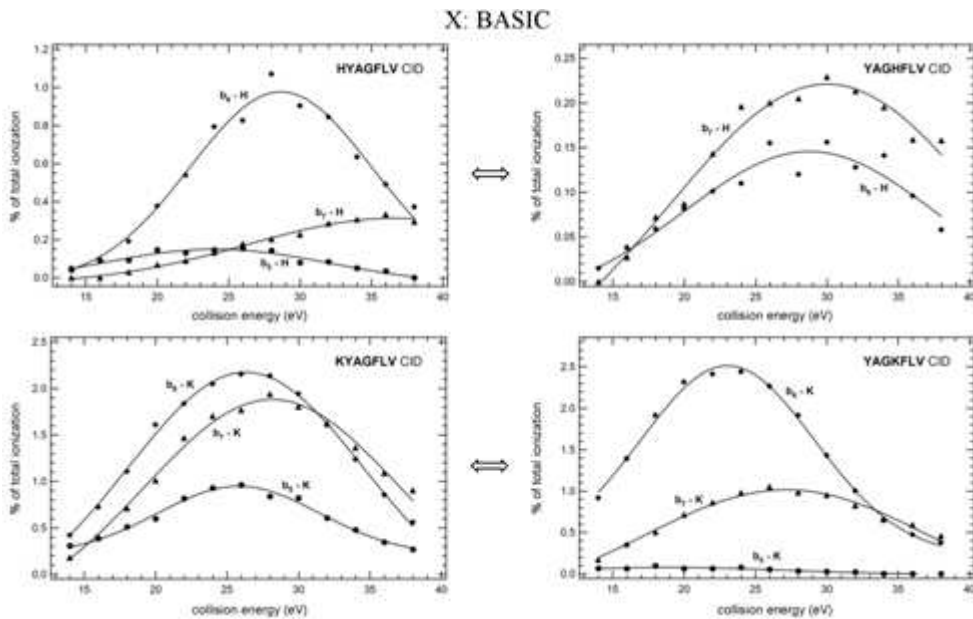
Şekil 39. Değişik peptit türevlerinden elde edilen  $b_6$  iyonlarının iyon şiddetlerinin enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları.



Ayrıca, XYAGFLV-NH<sub>2</sub> ve YAGXFLV-NH<sub>2</sub> peptit türevleri kullanarak elde edilen *b* iyonlarından asidik , bazik, polar ve polar olmayan amino asit grublarının *b<sub>n</sub>-X* (*n*= 5-7) kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları incelendiğinde *b<sub>6</sub>-X* ve *b<sub>7</sub>-X* profillerinin, *b<sub>5</sub>-X* profillinden daha kararlı olduğudur. Bu sonuçlar içerisinde QYAGFLV-NH<sub>2</sub> elde edilen sadece *b<sub>7</sub>-Q* farklı davranış göstermiştir. Bununla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar ile ilgili sonuçlar Asidikler için Şekil 40’da, bazikler için Şekil 41’de, polar olmayan amino asitler için Şekil 42’de ve polar grub ihtiva eden amino asitler için Şekil 43’de detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

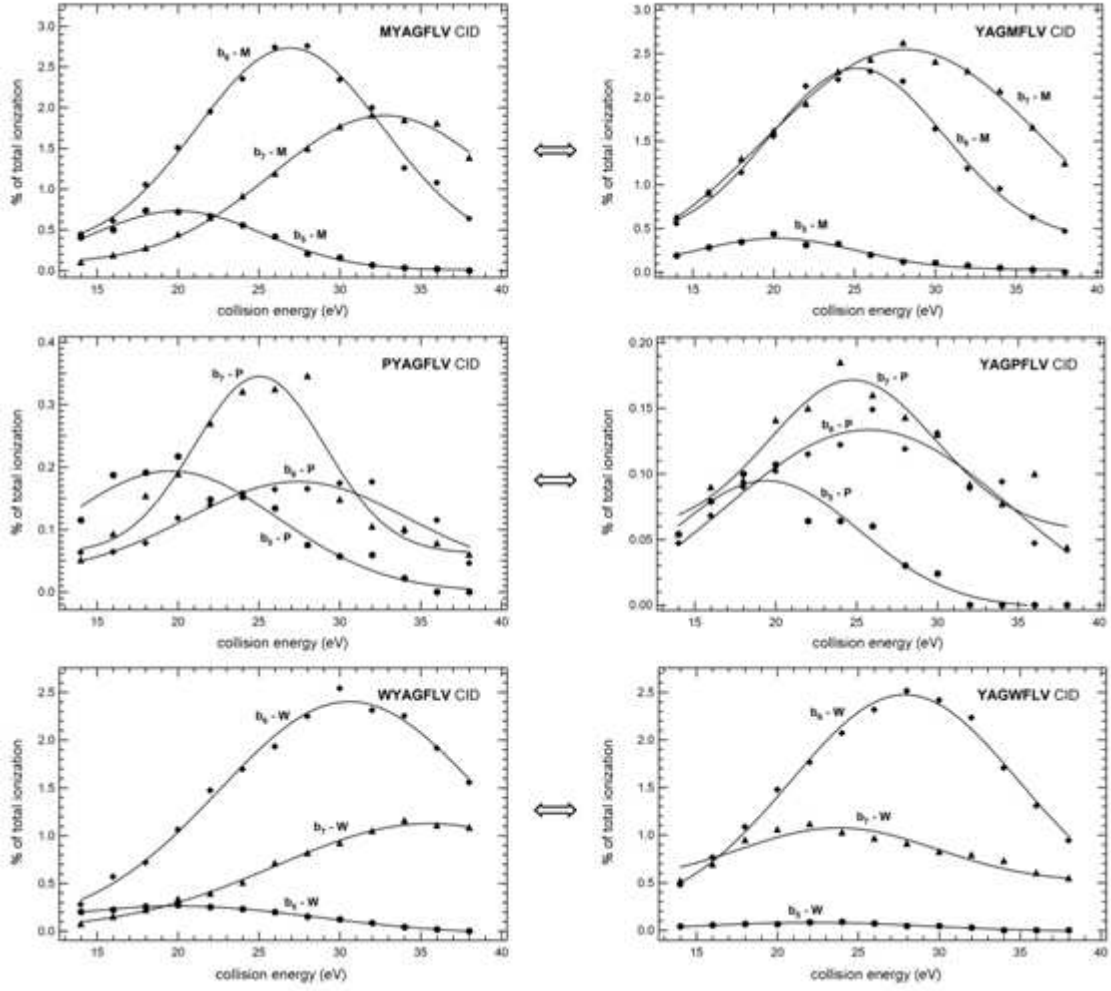


Şekil 40. Değişik peptit türevlerinden elde edilen *b* iyonlarından asidik amino asit grubunun kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları



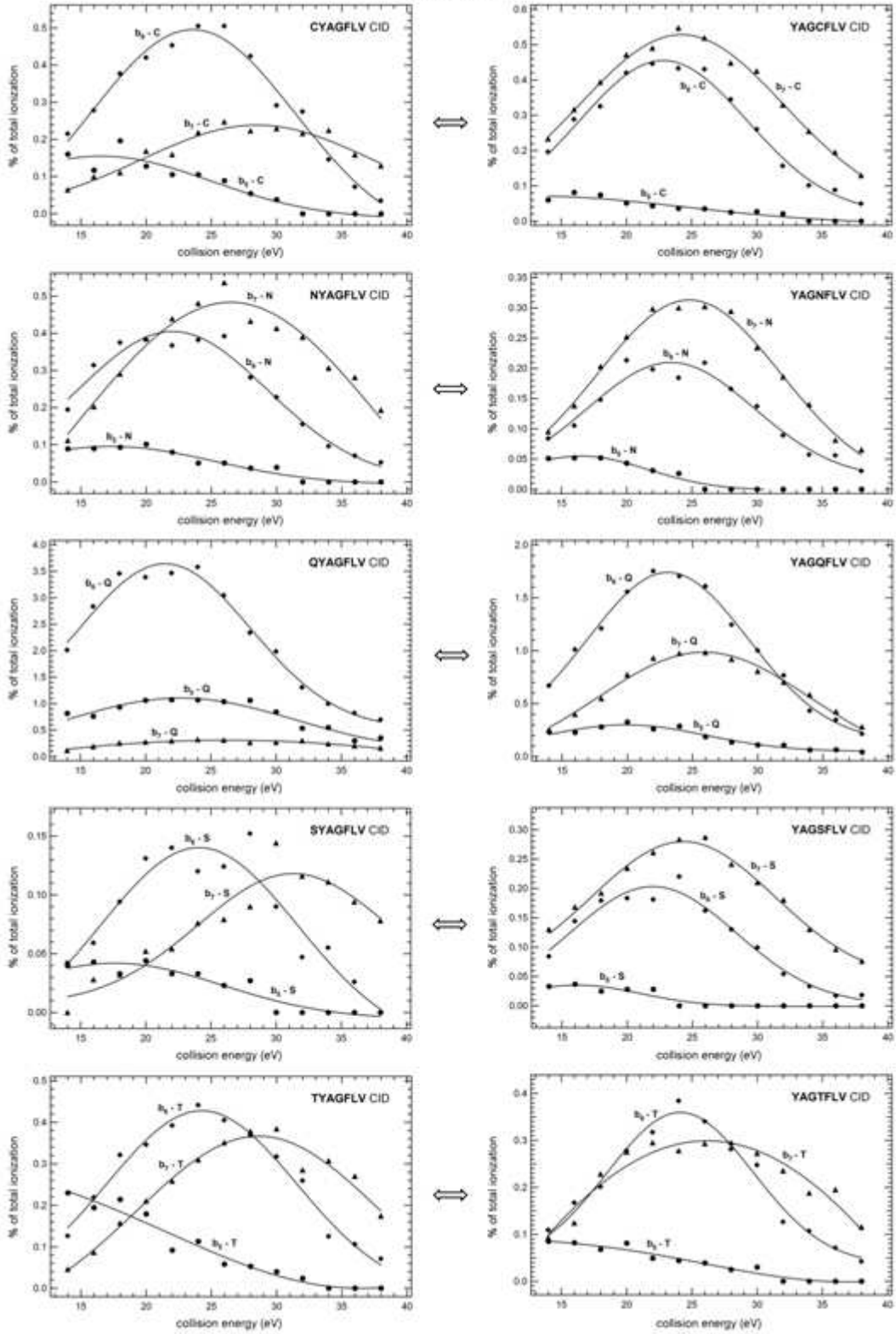
Şekil 41. Değişik peptit türevlerinden elde edilen *b* iyonlarından bazik amino asit grublarının kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları

X: NONPOLAR



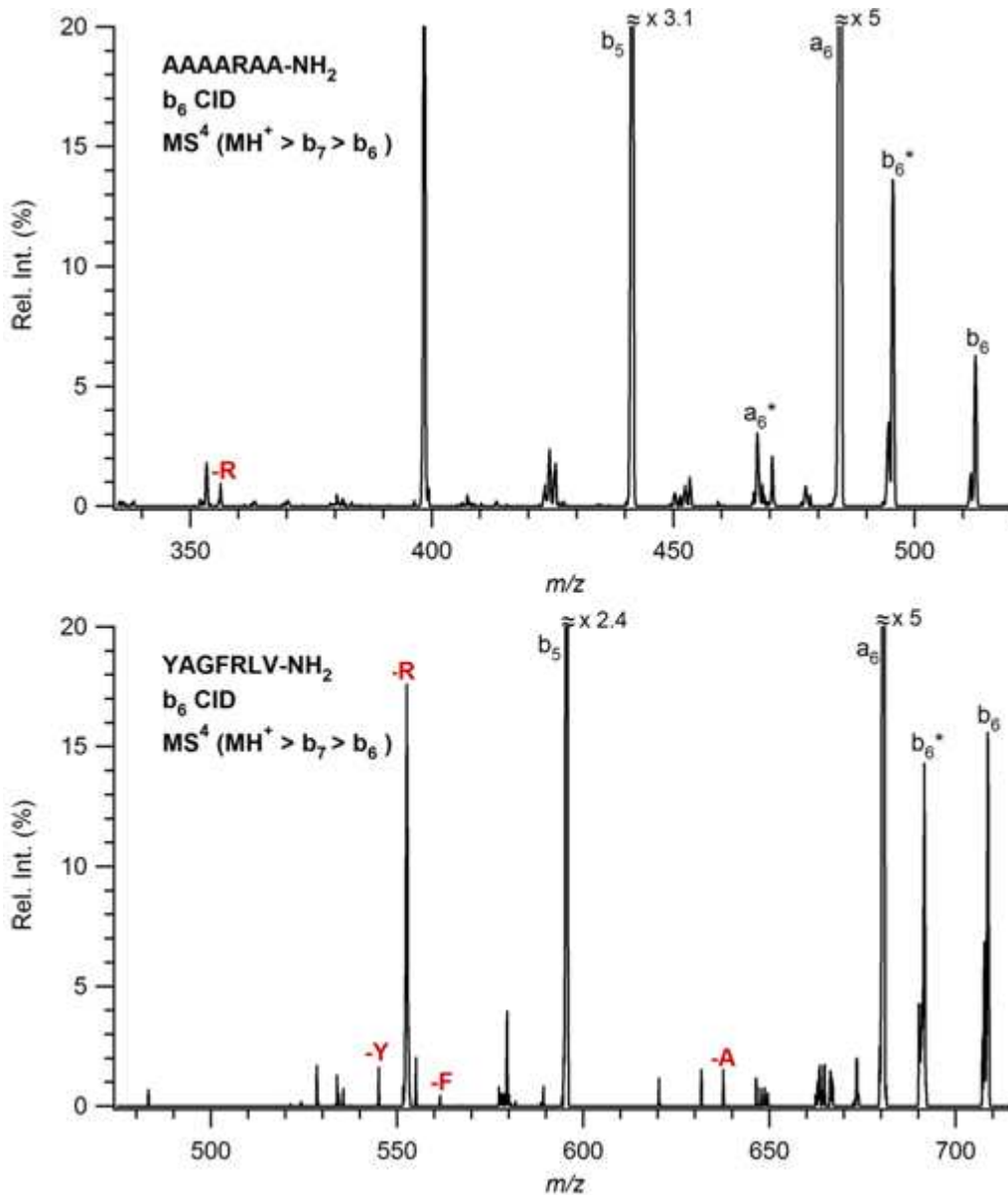
Şekil 42. Değişik peptit türevlerinden elde edilen  $b$  iyonlarından polar olmayan grupları bulunan amino asitlerin kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları

X: POLAR



Şekil 43. Değişik peptit türevlerinden elde edilen  $b$  iyonlarından polar grupları bulunan amino asitlerin kopmalarının enerjiye bağlı grafiksel değişim spektrumları

Ayrıca, RYAGFLV-NH<sub>2</sub>, YRAGFLV-NH<sub>2</sub>, YARGFLV-NH<sub>2</sub>, YAGRFLV-NH<sub>2</sub>, YAGFRLV-NH<sub>2</sub>, YAGFLRV-NH<sub>2</sub>, YAGFLVR-NH<sub>2</sub>, RAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAAAAAA-NH<sub>2</sub>, AAARAAA-NH<sub>2</sub>, AAAARAA-NH<sub>2</sub>, AAAAARA-NH<sub>2</sub>, ve AAAAAAR-NH<sub>2</sub> peptit türevleri ile arginin etkisi çalışılmış ve literatüre paralel olarak herhangi bir makrosiklik yapı oluşumu gözlenememiştir. Üçüncü rapor döneminde sunduğumuz raporda Şekil 44 de gösterilen **-R** kopması olduğunu düşündüğümüz sonuç yapılan detaylı çalışmalar sonucunda **V+G** kopması olduğu anlaşılmıştır. Çünkü **-R** kopmasının kütle ağırlığı 156 amu'ya karşılık gelmektedir ve aynı şekilde **V+G** kopmasında 99+57= 156 amu denk gelmektedir. Yapılan MS/MS çalışması bu sonucu desteklemiştir. Arginin ihtiva eden peptit türevlerinin literatürün aksine makrosiklik yapı oluşturduğu varsayımımızın yanlış olduğu yapılan bu detaylı çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Bünyesinde kuvvetli bazik olan arginin bulunduran bu peptit türevleri tamamıyla farklı davranış göstermişlerdir ve bu çalışmalar ile ilgili başka bir sonuç verilmemektedir.



Şekil 44. Arginin ihtiva eden model peptitlerinden izole edilen b<sub>6</sub> iyonunun MS<sup>4</sup> kütle spektrumu

Son olarak yapılan çalışmada Angiotensin ve Bradykinin peptitleri ile yapılan çalışmalarda ilk seri olarak angiotensin serisinde DRVYI-OH, DRVYIH-OH, DRVYIHP-OH, DRVYIHPF-OH, DRVYIHPFH-OH, DRVYIHPFHL-OH peptit türevleri kullanılmıştır. Bu çalışmada  $b_n$  ( $n=4-9$ ) iyonlarının MS/MS kütle spektrumları çalışmış ve gözlenebilen bir makrosiklik yapı gözlenmiştir. Bu çalışmadaki amaç, **C-Terminal** pozisyonundaki amino asitler birer birer eksiltildiğinde **b** iyon türünün makrosiklik oluşumuna etkisi bakılmış ve **N-terminal** bölgesinde bulunan **R** grubunu etkisi bariz bir şekilde gözlenmiştir. MS/MS kütle spektrumlarında  $b_n$ -D eliminasyonu en ilginç eliminasyon sinyali olarak gözlenmiştir (sonuçlar gösterilmemiştir).

Bu çalışma ile bağlantılı olarak RVYIHPFHL-OH, VYIHPFHL-OH, YIHPFHL-OH, IHPFHL-OH, HPFHL-OH peptit türevleri ile **N-terminal** pozisyonundaki amino asitler birer birer eksiltildiğinde **b** iyon türünün makrosiklik oluşuma etkisine bakılmıştır. MS/MS kütle spektrumlarında ikili ve üçlü amino asit eliminasyonları gözlenmiş, fakat makrosiklik oluşumunda net olarak gözlene tekli amino asit eliminasyonları bu serilerde gözlenmemiştir.

Ayrıca bradykinin ile yapılan çalışmada RPPGFSPFR-OH, RPPGFSPF-OH, RPPGFSP-OH, RPPGFS-OH, RPPGF-OH peptit türevleri ile yapılan çalışmada  $b_n$  ( $n=4-8$ ) iyon türünün MS/MS kütle spektrumunda herhangi bir makrosiklik oluşumunun göstergesi olan yoğun tekli amino asit eliminasyonu gözlenmemiştir. Tek ilginç gözlem her bir MS/MS spektrumunda  $m/z$  333 oluşumudur.

#### 4. SONUÇ

Bu çalışma kapsamında çıkan sonuçlar ile uluslar arası dergilerde üç adet bilimsel makale yayınlanmış ve 2 adet makale de yayına hazırlanmaktadır.

Asidik peptit türevleri ile yapılan çalışmada çıkan sonuç, makrosiklik yapının oluştuğu ve asidik grubun pozisyonun bu oluşuma olumlu yada olumsuz bir etkide bulunmadığıdır. Ayrıca aradaşık asidik grup ihtiva eden peptit türevlerinde makrosiklik yapının oluşumunu engellemediği açıkça gözlenmiştir. Makrosiklik yapının açılımının enerjiye bağlı olarak değişim gösterdiğide gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları detaylı bir şekilde yayınlanmıştır.

Histidine ihtiva eden peptit türevleri ile yapılan çalışmada ise literatürün aksine histidinin pozisyonunun makrosiklik oluşumuna etkisi olmadığı gözlenmiştir. Enerjiye bağlı grafiksel bağ açılım mekanizmaları incelendiğinde  $HA_6$ , ve  $A_3HA_3$  aynı profil dağılımı gösterirken,  $A_6H$  ile yapılan çalışma bu ikisinden tamamiyle farklılık göstermiştir. Bunun yanında  $HYAGFLV-NH_2$ ,  $YAGHFLV-NH_2$  ve  $YAGFLVH-NH_2$  serisi ile yapılan benzer çalışmada dikkat çekici bir farklılık gözlenmemiştir. Buda amino asit sekanslarının makrosiklik yapı oluşumunda etkisinin olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada detaylandırılarak yayına hazırlanmaktadır.

Sekansında lizin bulunduran peptit türevleri ile yapılan çalışmada ise lizin amino asitin yan grubunda bulunan serbest amin grubunda makrosiklik oluşuma katkısı olduğu ve ayrıca lizin amino asidin pozisyonunda makrosiklik yapı oluşumunda önemli olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları detaylı bir şekilde yayınlanmıştır.



Peptit büyüklüğü, pozisyonu, komşu amino asit etkisi ve yan grup etkilerinin incelendiği çalışma sonucunda, makrosiklik oluşumunun  $b_6$  ve  $b_7$  iyon türlerinin  $b_5$  iyon türüne göre daha kararlı oldukları gözlenmiştir.

YAGFLV-NH<sub>2</sub>, AGFLVY-NH<sub>2</sub>, GFLVYA-NH<sub>2</sub>, FLVYAG-NH<sub>2</sub>, LVYAGF-NH<sub>2</sub> ve VYAGFL-NH<sub>2</sub> peptit türevlerinin MS/MS kütle spektrumları ve “breakdown” grafikleri birbirileri ile aynı sonucu göstermiştir. Bunun sebebi, makrosiklik oluşumu sonunda bütün bu peptitlerin aynı sekans yapısına sahip olması ile açıklanabilir. Diğer yandan FAYVGL-NH<sub>2</sub>, GYYALF-NH<sub>2</sub> and VFYLAG-NH<sub>2</sub> model peptitleri, yukardaki peptit türevleri ile izomerik oldukları halde MS/MS kütle spektrumları ve “breakdown” grafiklerinin birbirlerinden ve bu seriden farklı olmaları ise makrosiklik oluşum sonunda amino asit dizilimleri farklı olduğundan dolayıdır. Bu sonuçlar komşu amino asitin makrosiklik yapının açılma yollarına etkisinin olduğunu açıkça göstermiştir. Buradan çıkan başka bir sonuç ise, makrosiklik yapının CID ortamında  $b$  iyonunda gözlenen tekli eliminasyonların herhangi bir düzen içinde olmadığıdır. Bu çalışmada detaylandırılarak yayınlanmıştır.

Bünyesinde hidroksil grubu ihtiva eden peptit türevleri ile sekans ve pozisyona bağlı olarak yapılan çalışma sonucunda **C-terminal** pozisyonunda bulunan protonlanmış di-peptit kopması gözlenmiştir. Literatürde ilk defa gözlenmiş olan bu mekanizma sayesinde peptitlerin amino asit sekanslarını bulmada yardımcı bilgi sağlanmaktadır. Bu bilgi sayesinde **C-terminal** pozisyonunda ki iki amino asit hakkında bilgi edinilmekte ve ayrıca bu peptit sekansında mutlaka bünyesinde hidroksil grubu bulunan bir peptit daha olmak zorunda olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmada detaylandırılarak yayına hazırlanmaktadır.

Bünyesinde arginin grubu bulunan peptit türevleri herhangi bir makrosiklik yapı oluştrmamaktadır ve MS/MS kütle spektrumları peptitlerin sekanslarına göre karmaşık olabilmektedir. Bradykinin ve angiotensin peptit serileri ile yapılan çalışmalarda makrosiklik yapı oluşumu ile ilgili herhangi bir sonuç elde edilememiştir.

## REFERANSLAR

Biemann K, Methods Enzymol., (1990), 193, 455-479.

Bleiholder C., Osburn S., Williams T.D., Suhai S., Stipdonk M. V., Harrison A. G., Paizs B., J. Am. Chem. Soc. (2008), 130, 17774-17789.

Bythell, B.J., Knapp-Mohammady, M., Paizs, B., and Harrison, A.G., "Effect of the His residue on the macrocyclization of the b ions.", J. Am. Soc. Mass Spectrom., (2010), 21, 1352-1328

Cox K. A., Gaskell S. J., Morris M., Whiting A., J. Am. Soc. Mass Spectrom. (1996), 7, 522-531.

Farrugia J.M., O'Hair R.A.J., and Reid G.A., "Ab Initio Studies on Protonated N-Acyl Amino Acid Methyl Ester Model Systems", Int. J. Mass Spectrom 210–211 (2001), pp.71–87.

Gonzales J., Beseda V., Garay H., Reyes O., Padron G., Tambara Y., Takao T., and Shimonishi Y., J. Mass Spectrom., (1996), 31, 150-158.

Harrison A.G., *J. Am. Chem. Soc.* (2008), 1776-1780.

Johnson, R.S., Martin, S.A., and Biemann K., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, (1988), 86, 137-154.

Roepstorff P., and Fohlman J., *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (11) (1984), p.601

Liu H., and Hakansson K., *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 18 (2007), pp.2007–2013.

Molesworth, S., and Van Stipdonk, M., "Apparent inhibition by arginine of macrocyclic b ion formation from singly charged protonated peptides.", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2010), 21, 1322-1328.

Molesworth, S., Osburn, S., and Van Stipdonk, M., "Influence of amino acid side chains on apparent selective opening of cyclic  $b_5$  ions", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2010), 21, 1028-1036.

Paizs B., Lendvay G., Vékey K., and Suhai S., Formation of  $b_2^+$  Ions from Protonated Peptides: An Ab Initio Study, *Rapid Commun. Mass Spectrom* 13 (1999), pp. 525–533.

Smith L.L., Herrmann K. A., and Wysocki V.H., 17 (2005), pp. 20-28.

Tsaprailis G., Somogyi A., Nikolaev E. N., Wysocki V. H., *Int. J. Mass Spectrom.* 2000, 195/196, 467-479.

Vachet R. W., Bishop B. M., Erickson B. W., Glish G. L., *J. Am. Chem. Soc.* (1997), 119, 24.

Wysocki V.H., Tsaprailis G., Smith L.L., and Brei L.A., 1997, *Int. J. Mass Spectrom.*, 35 (2000), pp.1399-1406.

Yalcin T., Khouw C., Csizmadia I.G., Peterson M.R., and Harrison A.G., *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 6(1995), pp.1165–1174.

Yalcin T., Csizmadia I.G., Peterson M.R., and Harrison A.G., The Structures and Fragmentation of  $B_n$  ( $n \geq 3$ ) Ions in Peptide Mass Spectra, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 7 (1996), pp. 233–242.



## PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

<b>Proje No: 109T436</b>
<b>Proje Başlığı:</b> PEPTİT TÜREVLERİNİN GAZ FAZI REAKSİYON MEKANİZMALARININ KÜTLE SPEKTROMETRE İLE İNCELENMESİ
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Doç. Dr. Talat Yalçın (Proje Yürütücüsü)
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi Kimya Bölümü 35430 Gülbahçe-URLA-İZMİR
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 35430 Gülbahçe-URLA İzmir
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.01.2010 – 01.07.2012</b>
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Bu çalışmada, değişik peptit türevleri kullanılarak direk olmayan gaz fazı parçalanma mekanizmalarının amino asit dizilimlerine göre nasıl davrandığı, özellikle asidik, bazik, polar ve non-polar grupların parçalanma mekanizmalarındaki etkileri detaylandırılarak çalışıldı. Bu çalışmalar sırasında, asidik peptitlerin, (glutamik asit ve aspartik asit) her ne pozisyonda olursa olsun direk olmayan parçalanma mekanizmasında her hangi bir etkisi olmadığı gösterildi (1). Bunun yanında bazik peptitlerden Lisine ihiva eden peptit türevlerinde lizin grubunun yan bağında bulunan $\epsilon$ -amine grubunda direk olmayan parçalanma mekanizmasında ve makrosiklik yapı oluşumunda etkin rol oynadığı gösterildi ve lizin amino asitin pozisyon etkisi detaylandırıldı (2). Ayrıca makrosiklik yapı oluşumunda peptit uzunluğu, amino asit pozisyonları, komşu amino asit etkileri ve yan grub etkileri detaylandırılarak çalışıldı (3). Ayrıca yan grubunda OH bulunan peptit grublarında bu tür peptitlere özgü parçalanma mekanizması detaylandırıldı (4). Histidine ve arginin ihitiva eden peptit türevlerinde çalışılarak makrosiklik yapıya etkileri detaylandırıldı (5).
<b>Kaynaklar:</b> 1. Atik AE., and Yalcin T., "Systematic Study of Acidic Peptides for b-Type Sequence Scrambling", J. Am. Soc. Mass Spectrom., 22, Number 1, 38-48, 2011 2. Atik AE., Gorgulu G., and Yalcin T., "The role of lysine epsilon-amine group on the macrocyclization of b ions", Int. J. Mass Spectrom., 316, pp.84-90, 2012 3. Tasoglu C., Gorgulu G., Yalcin T., "Investigation of peptide size, residue position, neighbor amino acid and side chain effect on macrocyclization of b(n) (n=5-7) ions" Int. J. Mass Spectrom., 316, pp.108-116, 2012. 4. Atik AE., and Yalcin T., "Protonated C-terminal Dipeptide Loss from $b_3$ and $b_4$ Ions of Side Chain Hydroxyl Group Containing Pentapeptides", in preparation 5. Tasoglu C., and Yalcin T., "Macrocyclic Structure of b ions obtained from Basic Amino Acid containing Peptides", in preparation
<b>Anahtar Kelimeler:</b> lisine $\epsilon$ -amine grubu, makrosiklik, peptit uzunluğu, yan grub, pozisyon, komşu amino asit, glutamik asit, aspartik asit, polar ve non-polar gruplar, bazik ve asidik amino asitler, gaz fazı parçalanma mekanizmaları
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> <u>Tez:</u> Atik AE., "Investigation of Gas Phase Reaction Mechanism of Peptides Containing Acidic Residues using Mass Spectrometry", (Ph.D, devam ediyor) Taşoğlu Ç., "Investigation of Gas Phase Reaction Mechanism of Peptides Containing Basic residues using Mass Spectrometry", (Ph.D, devam ediyor) <u>Makale:</u> 1) Atik A.E. and Yalcin T. "Systematic Study of Acidic Peptides for b-Type Sequence Scrambling" J. Am. Soc. Mass Spectrom., 22, Number 1, 38-48, 2011 2) Atik, A.E., Gorgulu, G., and Yalcin, T. "The role of lysine epsilon-amine group on the macrocyclization of b ions" Int. J. Mass Spectrom., 316, pp.84-90, 2012 3) Tasoglu, C., Gorgulu, G., and Yalcin, T. "Investigation of peptide size, residue position, neighbor amino acid and side chain effect on macrocyclization of b(n) (n=5-7) ions" Int. J. Mass Spectrom., 316, pp.108-116, 2012 <b>Sempozyum, Konferans Bildiri:</b>



1. Tasoglu C, Görgülü G., ve **Yalcin T.** "Preferential Opening of Macrocyclic b Ions with Respect to Positions and Nature of Amino Acid Residue", IX. Chemical Physics Congress, Oct 14-16, 2010, Çeşme-İZMİR.
2. Atik A. E., Görgülü G., ve **Yalcin T.**, " Characteristic Fragmentation Patterns of  $b_5^+$  and  $b_4^+$  Ions From Side Chain Hydroxyl Group Containing Pentapeptides", IX. Chemical Physics Congress, Oct 14-16, 2010, Çeşme-İZMİR.
3. Tasoglu C., and **Yalcin T.**, " Investigation of Fragmentation Mechanism of Peptides Containing Histidine Residue", 58<sup>th</sup> ASMS Conference, May 23-27, 2010, Salt Lake City, Utah, USA.
3. Atik A. E., and **Yalcin T.**, " Effect of Acidic Amino Acid on b-type Sequence Scrambling", 58<sup>th</sup> ASMS Conference, May 23-27, 2010, Salt Lake City, Utah, USA.
4. Tasoglu C., Atik A. E., and **Yalcin T.**, " Do  $a^*$  Ions From Isomeric Hexapeptides Provide Additional Sequence Information?", 18<sup>th</sup> International Mass Spectroscopy Conference 30th Aug-4th Sept. 2009, Bremen-GERMANY
5. Tasoglu C., Atik A. E., ve **Yalcin T.**, "Bazik Peptid Türevlerinin Gaz Fazı Reaksiyon Mekanizmalarının Q-Trap Kütle Spektrometresi ile İncelenmesi", XI. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 23-26 Haz. 2009, ANKARA.

**Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarının Başarı Öyküsü Niteliği Taşdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.**