

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORGANOSFATLARA MARUZİYET SONRASINDA
OLUŞAN PROTEİN EKLENTİ ÜRÜNLERİNİ TANIYAN
MONOKLONAL ANTİKORUN KARAKTERİZASYONU**

Ecz. Seda ÖNDER

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2018**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORGANOSFATLARA MARUZİYET SONRASINDA
OLUŞAN PROTEİN EKLENTİ ÜRÜNLERİNİ TANIYAN
MONOKLONAL ANTİKORUN KARAKTERİZASYONU**

Ecz. Seda ÖNDER

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Özden TACAL**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Oksana LOCKRIDGE**

**ANKARA
2018**







ONAY SAYFASI**ORGANOFOSFATLARA MARUZİYET SONRASINDA OLUŞAN PROTEİN
EKLENTİ ÜRÜNLERİNİ TANIYAN MONOKLONAL ANTİKORUN
KARAKTERİZASYONU**

Seda Önder

Danışman: Prof. Dr. Özden Tacal

İkinci Danışman: Prof. Dr. Oksana Lockridge

Bu tez çalışması 05.07.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Biyokimya Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Kamer Kılıç TOBB Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Özden Tacal Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Gülberk Uçar Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Aymelek Gönenc Gazi Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Ebru Bodur Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Z. Tuba Tüylü Küçükkılıç Hacettepe Üniversitesi	

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

30 Temmuz 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

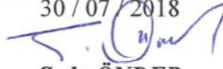
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

30 / 07 / 2018

Seda ÖNDER

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

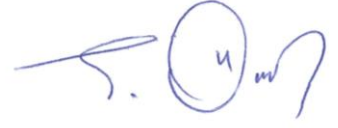
(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Özden TACAL ve Prof. Dr. Oksana LOCKRIDGE danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ecz. Seda ÖNDER



TEŞEKKÜR

“Ne başarılırsanız başarın, size yardım eden birileri ve teşekkür edilesi insanlar vardır”

Althea Gibson

Sabrı-azmi-bilmi ve her şeyden önemlisi önce *‘doğru insan, doğru bilim insanı’* olmayı öğreten, lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bana bir duruş-bir bakış ve hayatıma yepyeni vizyonlar kazandıran, her aşamada hiç vazgeçmeden benimle beraber mücadele eden ve bugün *‘bu hayali’* gerçeğe dönüştüren, çok saydığım-tarifsiz sevdiğim, doktora tez danışmanım Prof. Dr. Özden TACAL’a

Doktora eğitimime başlamam için ilk adımı atmamı sağlayan, manevi desteğini hiçbir aşamada esirgemeyen ve bu süreçte *‘sebat etmeyi’* öğreten Doç. Dr. N. Tuğba KANDİLCİ’ye

Tez çalışmamın deneyleri için laboratuvarlarını açıp-bana emanet eden ve bilimsel deneyim kazanmam için tüm imkanlarını sunmaya devam eden Prof. Dr. Oksana LOCKRIDGE, Lawrence M. SCHOPFER ve Alica DAFFENER’a

Mükemmel bir hayat sağlayan ve hayatımın her evresinde her zaman destek olan harika ailem-Hüseyin-Asuman-Sude ÖNDER’e, Aslı-Hakan-Burcu KILAR’a

Doktora programı süresince 2211-Yurt İçi Lisans Üstü Burs kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK’a

Sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Önder, S. Organofatlara Maruziyet Sonrasında Oluşan Protein Eklenti Ürünlerini Taniyan Monoklonal Antikorun Karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Organofosfat (OP) pestisitler, kolinesterazların [asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE)] tersinmez inhibitörüdür. OP'ler, akut toksik etkisini AChE'nin aktif bölgesindeki serin amino asidine kovalent bağlanarak göstermektedir. Aktif bölgede serin içermeyen proteinler (örneğin albümin) ise, tirozin ve lizin amino asitlerinden OP bileşikler ile kovalent olarak modifiye edilmektedir. OP'lerin tirozin amino asidi ile yaptığı kovalent bağ, serin ile yaptığı kovalent bağa göre daha stabildir. AChE ve BChE inhibisyonu, OP pestisitlere maruziyet sonrasında ortaya çıkan kronik hastalıkların nedenini açıklayamamaktadır. Kronik OP toksisitesinin nedeninin aydınlatılabilmesi için yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı, yeni biyobelirteçlerin belirlenmesinde kullanılmak üzere tirozine bağlı protein eklenti ürünlerini tanıyan bir monoklonal antikor tasarlamak ve karakterize etmektir. Çalışmada, farklı amino asit dizilerine sahip dietoksifosfotirozin peptitleri sentezlenip 4 farklı taşıyıcı proteine konjuge edildi. Konjuge proteinler kullanılarak hibridoma teknolojisi ile depY olarak isimlendirilen monoklonal antikor üretildi. DepY antikoruna saflaştırıldı ve bağlanma afinitesi ve özgüllüğünü belirlemek için ELISA, Western Blot, Biocore, Octet teknolojisi ile karakterize edildi. Sonuçlar, depY antikorunun, amino asit dizisinden bağımsız olarak sadece dietoksifosfotirozin modifiye protein ve peptitleri tanıdığını gösterdi. Ayrıca HEK293 hücre lizatları, klorprifos okson ile muamele edildi. Triptik peptitler, depY-Sefaroz reçine ile saflaştırılıp kütle spektrometri ile analiz edildiğinde; 73 proteine ait 116 dietoksifosfotirozin modifiye peptit tanımlandı. Sonuç olarak, depY monoklonal antikoruna, OP maruziyetinin yeni biyobelirteçlerinin tanımlanmasında ve herhangi bir türdeki dietoksifosfotirozin modifiye proteinlerin belirlenmesinde yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Organofosfat, klorprifos okson, depY monoklonal antikor, dietoksifosfotirozin, kütle spektrometri.

Bu tez, TÜBİTAK BİDEB 2211-A kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Onder S., Characterization of Monoclonal Antibody that Recognize Protein Adducts After Exposure to Organophosphates. Hacettepe University Institute of Health Sciences Ph. D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2018. Organophosphorus (OP) pesticides are irreversible inhibitors of cholinesterases [acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE)]. The OPs cause the acute toxic effect by covalent binding to a serine amino acid in the active site of AChE. Proteins that have no active site serine, such as albumin, are covalently modified by OPs on tyrosine and lysine. The covalent bond of OP compounds with tyrosine is more stable than with serine. Chronic illness from OP pesticides exposure is not explained by inhibition of AChE and BChE. New biomarkers are needed to elucidate the cause of chronic toxicity. The goal of this study was to design and characterize monoclonal antibody that recognizes protein adducts on tyrosine that would be useful in the identification of new biomarkers. Various diethoxyphosphate-tyrosine peptides were synthesized and cross-linked to 4 different carrier proteins. Monoclonal antibody called as depY were produced with hybridoma technology using the conjugated proteins. DepY antibody was purified and characterized by ELISA, Western Blot, Biocore, Octet technology to determine binding affinity and binding specificity. The results showed that depY recognizes diethoxyphospho-tyrosine modified proteins and peptides independent of the surrounding amino acid sequence. Furthermore, HEK293 cell lysates were treated with chlorpyrifos oxon. When tryptic peptides immunopurified with depY-Sepharose were analyzed by mass spectrometry, 116 diethoxyphosphate-tyrosine modified peptides from 73 proteins were identified. Consequently, the use of depY monoclonal antibody could be useful for identifying novel biomarkers of OP exposure and for analyzing modified proteins in any species.

Keywords: Organophosphate, chlorpyrifos oxon, depY monoclonal antibody, diethoxyphosphate-tyrosine, mass spectrometry.

This thesis was supported by TÜBİTAK (2211-A).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Organofosfatlar	3
2.1.1. Organofosfatların Genel Kimyasal Yapısı	4
2.2. Organofosfat Pestisitler	7
2.3. Klorprifos	8
2.3.1. Klorprifosun Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	8
2.3.2. Klorprifosa Maruziyet	9
2.3.3. Klorprifos Metabolizması	9
2.4. Klorprifos için Hedef Proteinler	11
2.4.1. Asetilkolinesteraz: Klorprifosun Birincil Hedefi	11
2.4.2. Nöropati Target Esteraz	14
2.4.3. Bütirilkolinesteraz	14
2.4.4. Serin Hidrolazlar	18
2.4.5. Düşük Doz OP Maruziyeti	19
2.4.6. Diğer Klorprifos Hedefleri	19
2.4.7. Beta Glukronidaz	20
2.4.8. Açilpeptit Hidrolaz	20
2.4.9. Reseptörler	21
2.4.10. Albümin	22
2.4.11. Tübülin	23

2.5. Tirozin	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Gereçler	29
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. Dietoksifosfotirozin İçeren Peptitlerin Hazırlanması	30
3.2.2. Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitlerin Saflaştırılması	31
3.2.3. Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitler için Amino Asit Miktar Tayini ve Spektrumlarının Analizi	31
3.2.4. Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitlerin Taşıyıcı Proteinlere Konjugasyonu	32
3.2.5. MALDI-TOF Kütle Spektrometri ile Taşıyıcı Proteinlere Bağlı Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptit Sayılarının Belirlenmesi	33
3.2.6. Proteinlerin Klorprifos Okson ile Muamele Edilmesi	33
3.2.7. Monoklonal Antikor Üretimi	34
3.2.8. Monoklonal Antikorum Saflaştırılması	35
3.2.9. Saflaştırılmış DepY'nin İzotipinin Belirlenmesi	35
3.2.10. DepY İmmobilize Sefaroz Reçinenin Hazırlanması	35
3.2.11. ELISA	36
3.2.12. Western Blot Analizi	36
3.2.13. İnsan Serum Albümine Konjuge Dietoksifosfolizinin Hazırlanması ve DepY Monoklonal Antikor ile ELISA	37
3.2.14. Klorprifos Okson, Diklorvos ve Krezil Saligenin Fosfat ile Modifiye İnsan BChE'nin Hazırlanması ve DepY Monoklonal Antikor ile ELISA	37
3.2.15. Diklorvos ile Modifiye Peptitlerin Hazırlanması ve DepY Monoklonal Antikor ile İmmuno MALDI	38
3.2.16. IC ₅₀ Değerinin Yarışmalı ELISA ile Belirlenmesi	39
3.2.17. K _d Değerinin Bio-Layer İnterferometri ile Belirlenmesi	39
3.2.18. K _d Değerinin Biacore Analizi ile Belirlenmesi	40
3.2.19. DepY Monoklonal Antikor ile Tanımlanabilen En Düşük Antijen Miktarının Western Blot Analizi ile Belirlenmesi	40

3.2.20. İnsan Serum Albümine Konjuge O-fosfo-L-tirozinin Hazırlanması ve PY20 Monoklonal Antikor ile Western Blot Analizi	40
3.2.21. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Klorprifos Okson ile Muamele edilmesi	41
3.2.22. Hücre Lizatlarının ELISA ile Analizi	43
3.2.23. Hücre Lizatlarının Kapiller Elektroferez- Western Blot ile Analizi	43
3.2.24. Kütle Spektrometri Analizleri için Hücre Lizat Örneklerinin Hazırlanması	43
3.2.25. Triple-TOF 6600 Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometri	45
3.2.26. OrbiTrap Fusion Lumos Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometri	46
4. BULGULAR	48
4.1. OP-Peptitlerin Soğurma Katsayıları	48
4.2. Taşıyıcı Proteinlere Konjuge Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitlerin ve Kontrol Peptitlerin Sayısı	48
4.3. Klorprifos Okson ile Muamele Edilen Proteinlerde Modifiye Olan Amino Asitler ve Miktarları	51
4.3.1. İnsan Albümini	51
4.3.2. Fare Albümini	52
4.3.3. Aprotinin	53
4.3.4. Kazein	53
4.3.5. Sığır Tübülin	56
4.3.6. Domuz Tübülin	58
4.4. DepY Monoklonal Antikor İzotipi	62
4.5. DepY Monoklonal Antikor Farklı Amino Asit Dizisine Sahip Dietoksifosfotirozin Modifiye Proteinleri Tanımaktadır	62
4.6. DepY Monoklonal Antikor Dietoksifosfolizin Modifiye Proteinleri Tanımamaktadır	65
4.7. DepY Monoklonal Antikor CBDP, Diklorvos ve CPO Modifiye İnsan BChE'yi Tanımamaktadır	65
4.8. DepY Monoklonal Antikor Diklorvos Modifiye Tirozini Tanımamaktadır	66

4.9. Dietoksifosfotirozin Modifiye Domuz Tübülünün DepY Monoklonal Antikora Bağlanma Afinitesinin Yarışmalı ELISA ile Analizi	68
4.10. Dietoksifosfotirozin Modifiye Proteinlerin DepY Monoklonal Antikora Bağlanma Afinitesinin Bio-Layer İnterferometri ile Analizi	68
4.11. Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitlerin DepY Monoklonal Antikora Bağlanma Afinitesinin Biacore ile Analizi	71
4.12. DepY Monoklonal Antikor ile Tanımlanabilen En Düşük Antijen Miktarının Belirlenmesi	72
4.13. Anti-fosfo-L-tirozin Monoklonal Antikoron (PY20) Dietoksifosfotirozin Modifiye Proteinleri Tanımamaktadır	73
4.14. Klorprifos Okson ile Muamele Edilen HEK 293 Hücre Lizatlarının ELISA ile Analizi	74
4.15. Klorprifos Okson ile Muamele Edilen HEK 293 Hücre Lizatlarının Kapiller Elektroferez- Western Blot ile Analizi	74
4.16. Klorprifos Okson ile Muamele Edilen HEK 293 Hücre Lizatlarının LC-MS/MS Kütle Spektrometri ile Analizi	76
5. TARTIŞMA	88
5.1. Hedef Olarak Dietoksifosfotirozinin Seçilme Nedeni	88
5.2. Literatürde OP Eklenti Ürünlerini Tanıyan Antikorlar	89
5.3. Aktif Bölgesinde Serin İçermeyen Proteinlerde Tirozin ve Lizin Amino Asitleri, Serine Göre Daha Reaktiftir	89
5.4. DepY Monoklonal Antikor Seçiciliği	90
5.5. DepY Monoklonal Antikor için Afinitite	91
5.6. CPO ile Tirozin üzerinden Kovalent Olarak Modifiye Edilen Proteinler	92
5.7. Fizyolojik İlişki	93
5.8. Fosfo-tirozin Bölgeleri ile Reaksiyon	94
5.9. Diğer OP Çalışması ile Karşılaştırma	95
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
7. KAYNAKLAR	98
8. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
Arg	Arjinin
BChE	Bütirilkolinesteraz
BG	Beta-glukuronidaz
BSA	Sığır serum albümini
CBDP	Krezil saligenin fosfat
CID	Çarpışma indüklü disosiyasyon
CPF	Klorprifos
CPO	Klorprifos okson
Cys	Sistein
DEP	Dietoksifosfat
DepY	Dietoksifotirozin modifiye proteinleri tanıyan monoklonal antikor
DETP	Dietiltiyofosfat
DFP	Diizopropilflorofosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Ditiyotreitol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karboimid
EPA	Çevre Koruma Ajansı
FBS	Fötal sığır serumu
FP	Florofosfat
Gly	Glisin
HCD	Yüksek enerji çarpışma indüklü disosiyasyon
HEK 293	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
His	Histidin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRP	Yaban turpu peroksidaz
HSA	İnsan serum albümin
IC₅₀	%50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
K_d	Disosiyasyon sabiti
LC-MS /MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi

Lys	Lizin
MALDI	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon
MES	2- [N-morfolino] etansülfonik asit
MS	Kütle spektrumu
NHS	N-hidroksisüksinimid
NMDA	N-metil-D-aspartat
NTE	Nöropati target esteraz
OP	Organofosfat
OPD	o-fenilendiamin
PBS	Fosfat ile tamponlanmış salin
PON-1	Paraoksonaz
PVDF	Polivinilidenflorit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
Ser	Serin
TBS	Tris ile tamponlanmış salin
TBST	%0.05 Tween 20 içeren Tris ile tamponlanmış salin
TCP	3,5,6-trikloro-2-piridinol
TFA	Trifloroasetik asit
Thr	Treonin
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
Tyr	Tirozin
UHPLC	Ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
UNMC	Nebraska Üniversitesi Tıp Fakültesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
α-CHCA	α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Klorprifos kimyasal yapısı	8
2.2. Klorprifosun metabolik biyoaktivasyonu	10
2.3. Asetilkolinesterazın aktif bölgesindeki katalitik serinin klorprifos ile konjugasyonu	12
2.4. Asetilkolinesterazın OP yapılı bileşikler tarafından inhibisyonu, yaşlanma reaksiyonu ve nükleofilik ajan aracılığıyla reaktivasyonu	13
2.5. OP bileşiklerin biyoaktivasyonu ve BChE ile etkileşimi	15
2.6. OP ile modifiye insan BChE aktif bölge peptidinin MS/MS spektrumu	16
2.7. Pepsin ile parçalanmış OP ile modifiye BChE	17
2.8. Soman ile modifiye serin için beta-eliminasyon reaksiyonunun şematik diyagramı	18
2.9. CPF ve CPO'nun albümin ve BChE üzerindeki eklenti ürünleri	22
2.10. OP ile modifiye beta tübülünü tanımlayan MS/MS spektrumu	24
2.11. Fare beyininde anormal mikrotübül yapısını gösteren atomik kuvvet mikroskobu görüntüsü	25
2.12. Tirozinat anyonunun klorprifos okson ile reaksiyonu.	27
3.1. CPO ile muamele edilmiş hücre lizatları ile çalışma planı	42
4.1. Kütle spektrometri ile BSA'ya konjuge dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin sayısının belirlenmesi	49
4.2. İnsan albüminin (P02768) amino asit dizisi	51
4.3. Fare albüminin (P07724) amino asit dizisi	52
4.4. Sığır Aprotininin (P00974) amino asit dizisi	53
4.5. Alfa S1 kazein (P02662) izoformunun amino asit dizisi	54
4.6. Alfa S2 kazein (P02663) izoformunun amino asit dizisi	54
4.7. Beta kazein (P02666) izoformunun amino asit dizisi	55
4.8. Kappa kazein (P02668) izoformunun amino asit dizisi	56
4.9. Sığır tübülün alfa-1B zincirinin (P81947) amino asit dizisi	56
4.10. Sığır tübülün beta-4B zincirinin (E1B953) amino asit dizisi	57
4.11. Domuz tübülün alfa-1A zincirinin (P02550) amino asit dizisi	58
4.12. Domuz tübülün alfa-1B zincirinin (Q2XVP4) amino asit dizisi	60

4.13. Domuz túbülin beta zincirinin (Q767L7) amino asit dizisi	61
4.14. CPO-modifiye YGGFL ve diklorvos-modifiye GGYR peptitler için depY monoklonal antikor ile immüno MALDI	67
4.15. DepY'nin CPO modifiye domuz túbülin için bağlama afinitesi	68
4.16. DepY'nin bağlama afinitesinin bio-layer interferometri ile analizi	69
4.17. DepY monoklonal antikor ile HSA'ya konjuge YGGFL-DEP peptidinin Western Blot görüntüsü	72
4.18. Anti-fosfo-L-tirozin monoklonal antikor (PY20) ile Western Blot görüntüsü	73
4.19. DepY'nin CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatlarındaki proteinlerle etkileşiminin ELISA ile analizi	74
4.20. DepY'nin HEK 293 hücre lizatlarındaki dietoksifosfotirozin modifiye proteinler ile etkileşiminin kapiller elektroforez-Western blot ile Analizi	75
4.21. 60S ribozomal protein L6 proteinine (Q02878) ait dietoksifosfat ile modifiye YYPTEDVPR peptidin MS/MS spektrumu	87
5.1. Klorprifos okson ve tirozin arasında gerçekleşen tepkime	93

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Organofosfat yapılu bileşiklerin genel kimyasal yapısı	4
2.2. Kimyasal silah ve pestisit olarak kullanılan organofosfat yapılu bileşiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	5
3.1. Dietoksifosfotirozin içeren peptitlerin hazırlanmasında kullanılan peptitler	31
3.2. Taşıyıcı proteinlere bağlı dietoksifosfotirozin modifiye peptitler	32
3.3. CPO ile modifiye olan proteinler	34
4.1. Taşıyıcı proteine konjuge dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin sayısı	50
4.2. Taşıyıcı proteine konjuge kontrol peptitlerin sayısı	50
4.3. İnsan albümini için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	51
4.4. Fare albümini için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	52
4.5. Aprotinin için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	53
4.6. Alfa S1 kazein için dietoksifosfat ile modifiye ve fosforile olan amino asitler	54
4.7. Alfa S2 kazein için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	55
4.8. Beta kazein için dietoksifosfat ile modifiye ve fosforile olan amino asitler	55
4.9. Kappa kazein için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	56
4.10. Sığır tübülün alfa-1B zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	57
4.11. Sığır tübülün beta-4B zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	57
4.12. Domuz tübülün alfa-1A zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	59
4.13. Domuz tübülün alfa-1B zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler	60
4.14. Domuz tübülün beta zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.	61
4.15. DepY monoklonal antikoru, farklı amino asit dizisine sahip dietoksifosfotirozin modifiye proteinleri ve peptitleri tanınması	64
4.16. DepY'nin CPO-modifiye ve kontrol proteinleri bağlamasına ilişkin bio-layer interferometri sonuçları	70
4.17. Dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin depY monoklonal antikora bağlanma afinitesinin Biacore ile Analizi	71
4.18. CPO (1 mM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler	78

4.19. CPO (10 μ M ve 250 μ M) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler	84
4.20. CPO (10 μ M, 250 μ M ve 1000 μ M) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde lizinden ve serinden modifiye olan peptitler/proteinler	86
5.1. DepY monoklonal antikorun bağlanmadığı haptenerler	91



1. GİRİŞ

Organofosfatlar (OP), merkezi ve otonom sinir sisteminde, asetilkolinesterazın (AChE) aktif bölgesindeki serin amino asidine geri dönüşümsüz şekilde bağlanarak dokularda asetilkolin (ACh) birikimine neden olmaktadır. ACh birikimi ile muskarinik ve nikotinik reseptörlerin aşırı uyarılması ile kolinerjik etkiler ortaya çıkmakta ve akut toksisite meydana gelmektedir (1, 2).

Düşük dozlardaki OP maruziyeti sonucu oluşan kronik hastalıkların mekanizması şimdiye kadar aydınlatılamamıştır. AChE aktivitesini etkilemeyen dozlardaki OP pestisitlere maruz kalan işçilerde, daha sıklıkla anksiyete bozukluğu, majör depresyon, dikkat dağınıklığı ve ekstrapiramidal semptomlar görülmüştür (3, 4). AChE inhibisyonu ile ilişkili olmayan OP kaynaklı nörotoksisite mekanizmasını açıklayabilmek için araştırmalar halen devam etmekte olup, düşük doz OP toksisitesinde birçok proteininin ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda; OP pestisitleri tarafından modifiye edilen proteinlerin AChE, bütirikolinesteraz (BChE), karboksilesteraz ve albümin olduğu rapor edilmiştir (5). OP pestisitlerinden klorprifosa (CPF) maruziyetten 49 gün sonra, insan serum albüminin 411. pozisyonda bulunan tirozin amino asidi üzerinde dietoksifosfat eklenti ürününün saptandığı gösterilmiştir (6). Ancak albümin tek başına nörotoksisiteyi açıklayamamaktadır ve sonuçlar OP toksisitesinde serin hidrolazlara ek olarak başka proteinlerin de rol oynadığını göstermektedir.

Proteinlerde bulunan tüm tirozinler, OP yapılı bileşikler ile reaksiyona girmemektedir. Tirozinin reaktivitesi, pozitif yüklü bir amino asidin tirozine 6 Å'luk yakınlığı ile kolaylaşmaktadır (7). Tirozin-OP eklenti ürünü oluştuktan sonra stabil kalmaktadır. Buna ek olarak, kolinesterazların aktif bölgesindeki serin amino asidi üzerinde gerçekleşen ve yaşlanma (aging) adı verilen reaksiyon, tirozin amino asidi üzerinde gerçekleşmemektedir (8-10). Tüm bu özellikler, OP'ler ile reaksiyona giren diğer proteinlerin kimliğinin ortaya konması ve antikor üretiminde uygun adayların belirlenmesi için tirozin-OP eklenti ürünlerini, antijen olarak çekici hale getirmektedir.

Bu doktora tez çalışmasında, tirozin etrafındaki amino asit dizisinden bağımsız olarak, dietoksifosfotirozin ile modifiye proteinleri yüksek afinite ve duyarlılık ile tanıyan bir monoklonal antikor (depY) üretilmiş ve detaylı olarak karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, OP yapılı bileşiklerin, hangi proteinleri modifiye ettiği

kütle spektrometri yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. DepY antikorun, OP bileşiklere maruziyet sonrasında yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasında ve kronik nörotoksisite mekanizmasının aydınlatılmasında faydalı olacağı düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Organofosfatlar

Pestisitlerin ana sınıflarından birini oluşturan organofosfatlar, ilk kez 1854 yılında Philippe de Clermont tarafından tetraetilpirofosfat olarak sentezlenmiştir. 1932 yılında, dimetil ve dietil fosforidat sentezlerinin tanımlanması ile OP esterlerinin, insanlarda görme ve solunum fonksiyonları üzerinde toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. 1937 yılında Alman kimyacı Gerhard Schrafer tarafından antikolinesteraz etkili OP bileşiklerinin genel kimyasal yapısı tanımlanmış ve ilk ticari OP insektisiti ve paratyon sentezlenmiştir (11, 12).

Tarım alanında başlıca pestisit olarak kullanılan OP'lerin, tıp ve endüstriyel alanında lubrikant, solvent ve yangın geciktirici olarak kullanımı da bulunmaktadır (13). İkinci Dünya Savaşı sırasında pestisit olarak kullanımı dışına çıkılarak, kimyasal savaş ajanı olarak kullanılmak üzere daha toksik OP yapılı bileşikler sentezlenmiştir (12). Sinir gazları olarak da adlandırılan bu ajanlardan sarin kullanılarak Japonya'da terörist saldırıları düzenlenmiştir (14).

OP yapılı bileşiklerin primer hedefi olarak; bu bileşikler varlığında tersinmez olarak inhibe edilen kolinesterazlar gösterilmektedir (15). 1950'lerin sonlarına doğru, AChE ve BChE'nin diizopropilflorofosfat (DFP) ile reaksiyonu sonrasında oluşan eklenti ürünlerinin, kolinesterazların aktif merkezinde bulunan serin amino asidi üzerinde olduğu gösterilmiştir (15, 16). 1963 yılında, her iki enzim için OP'ler tarafından modifiye edilen serin etrafındaki amino asit dizileri Sanger tarafından tanımlanmıştır (16). Ayrıca Sanger aynı yıl, insan serum albümininde (HSA) dizilediği ArgTyrThrLys peptid sekansındaki tirozin amino asidinin, DFP ile kovalent etkileşime girerek modifiye olduğunu göstermiştir ve bu gözlem 2005 yılında yeniden doğrulanmıştır (17).

Son yıllarda kolinesterazlardan başka farklı proteinler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda, OP'lerin tirozin ve lizin amino asitleri ile kovalent etkileşimde bulunduğu rapor edilmiştir (7, 10, 18). Bu durum, OP yapılı bileşiklerin, kolinesterazların aktif bölgesinde bulunan serin amino asidi dışında başka hedeflerinin de olduğunu göstermektedir (7, 10, 18).

2.1.1. Organofosfatların Genel Kimyasal Yapısı

Organofosfatlar, fosforik asit esterleri ve türevlerinden oluşmaktadır. Genel kimyasal yapısı (Tablo 2.1.), merkezi bir fosfor atomu ve ona çift bağ ile bağlı sülfür veya oksijen atomu şeklindedir (12). OP'ler, kolinesterazları fosforillerken, hidrolize en duyarlı ve ayrılan grup (X), enzimin aktif bölgesinde bulunan serin amino asidinin hidroksil oksijeni ile nükleofilik olarak yer değiştirmektedir (11).

Tablo 2.1. Organofosfat yapıları bileşiklerin genel kimyasal yapısı.

Organofosfat türü	Kimyasal yapı
Okso-fosforil bileşikler	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{P}-\text{X} \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$
Tiyo-fosforil bileşikler	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{P}-\text{X} \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$

Ayrılan grubun karakteristik özelliklerine göre OP yapıları bileşikler, 4 ana gruba ayrılmaktadır: 1. grup OP'ler, kimyasal silah olarak geliştirilen fosforilkolinlerdir ve ayrılan grupta dörtlü azot grubu içermektedir (Ör. shradan). 2. grup OP'ler, ayrılan grupta flor içeren florofosfatlardır ve hem toksisiteleri hem de işlevleri açısından 1. grup OP'lere benzemektedir (Ör. diizopropilflorofosfat). 3. grup OP'lerde, ayrılan grupta siyanür veya flor dışında farklı bir halojen bulunmaktadır. Bu grup bileşikler, 1. ve 2. grup OP yapıları bileşiklere göre daha az etkilidir (Ör. paratyon). 4. grup OP'ler ise, günümüzde insektisit olarak kullanılan OP yapıları bileşikler içermektedir ve ayrılan grupta alkoksi, alkiltiyo, ariloksi, ariltiyo veya heterosiklik yapılar, yer almaktadır (19).

OP'lerin yapısındaki R₁ ve R₂, yan grupları, fosfor atomuna doğrudan (fosfonatlar veya fosfinatlar) ya da oksijen veya sülfür atomu aracılığı ile (fosforotiyoat) bağlanmaktadır. En basit OP'lerin yapısındaki R₁ ve R₂ grupları genellikle aynı olup, metil, etil, izopropil vb. kısa alkil zincirleri bulunmaktadır (12).

Pestisit veya kimyasal silah olarak kullanılan OP yapıları bileşikler, R₁, R₂ yan gruplarının ve ayrılan grubun (X) karakteristik özelliklerine göre birçok gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar Tablo 2.2.'de özetlenmiştir (12).

Tablo 2.2. Kimyasal silah ve pestisit olarak kullanılan organofosfat yapıları bileşiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.

Organofosfat türü	Kimyasal yapı	Örnek
Fosfatlar		
<i>O,O'</i> Dialkil-fosfat	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{OR}_2 \\ \backslash \\ \text{OX} \end{array}$	Tri- <i>o</i> -krezil fosfat, diklorvos
Tiyofosfatlar		
<i>O,O'</i> Dialkil-tiyofosfat	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{X} \\ \backslash \\ \text{OR}_2 \end{array}$	Klorprifos, diazinon
<i>O,O'</i> Dialkil-fosforoditiyoat	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{SX} \\ \backslash \\ \text{OR}_2 \end{array}$	Malatyon, dimetoat
<i>O</i> -Alkil, <i>S</i> -alkil fosforoditiyoat	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{R}_1\text{S}-\text{P}-\text{OX} \\ \backslash \\ \text{OR}_2 \end{array}$	Fosmet
Fosforotiyoat		
<i>O,O'</i> Dialkil-fosforotiyoat	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{SX} \\ \backslash \\ \text{OR}_2 \end{array}$	Amiton, ometoat
<i>O</i> -Alkil, <i>S</i> -alkil fosforotiyoat	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1\text{S}-\text{P}-\text{OX} \\ \backslash \\ \text{OR}_2 \end{array}$	Trifenofos

Tablo 2.2. (Devam) Kimyasal silah ve pestisit olarak kullanılan organofosfat yapıları bileşiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.

Organofosfat türü	Kimyasal yapı	Örnek
Fosforoamidat		
<i>O,O'</i> Dialkil fosforoamidat	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{NR}_2 \\ \\ \text{OR}_2 \end{array}$	Fenamifos
<i>O</i> -Alkil, <i>S</i> -alkil fosforotiyoamidat	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{NR}_2 \\ \\ \text{SR}_2 \end{array}$	Metamidofos
<i>O,O'</i> Dialkil fosforotiyoamidat	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{NR}_2 \\ \\ \text{OR}_2 \end{array}$	İsofenos
Fosfonofloridat		
<i>O</i> -Alkil, alkil fosfonofloridat	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{F} \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$	Soman, sarin (Kimyasal silah-sinir gazı)
Fosforofloridat		
<i>O,O'</i> Dialkil fosforofloridat	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{F} \\ \\ \text{OR}_2 \end{array}$	Diizopropil fosforofloridat (DFP)
Fosfonotiyonat		
<i>O</i> -Alkil, alkil fosfonotiyonat	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{OR}_1-\text{P}-\text{OX} \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$	Leptofos

2.2. Organofosfat Pestisitler

Pestisitler, tarımda bitkilerin korunması veya halk sağlığında vektör kaynaklı hastalıkların önlenmesi amacı ile kullanılan, çeşitli yapı ve fonksiyonel gruplara ayrılmış kimyasal maddelerdir. (20). Dünya çapında pestisit kullanımı yıllık beş milyar kilogram iken (21), Türkiye’de pestisit kullanımı dünyadaki kullanımının sadece %1’lik kısmını oluşturmaktadır (22). OP pestisitleri, böcek ve pestlere karşı daha seçici olmaları ve daha az miktarda kalıntı bırakmaları nedeniyle dünya genelinde daha sıklıkla kullanılmaktadır (22). Paratyon, malatyon, klorprifos, diazinon ve fosmet yaygın olarak kullanılan OP pestisitlerine örnek olarak verilebilir (13). Klorprifos gibi 4 milyar kg OP pestisit, her yıl, tarım alanlarına uygulanmaktadır, ancak bunun çok az miktarı pestleri hedeflemekte, geri kalan kısmı ise çevreyi kirletmektedir (23).

Avrupa’da, bebek maması ve işlenmiş gıda dahil olmak üzere pek çok ürünün 250’den fazla farklı OP’ler ile kontamine olduğu ve buna ek olarak, meyve, sebze ve tahılların yaklaşık %50’sinin OP pestisit kalıntıları içerdiği bildirilmiştir (24).

OP pestisitlerinin dünya çapında yaygın kullanımı ile, tarım çalışanlarına ek olarak genel popülasyon da genellikle düşük konsantrasyonlarda farklı kimyasal yapıya sahip çeşitli pestisitlerin kombinasyonlarına maruz kalmaktadır (20). Bu maruziyet, kanser, nörodejeneratif kronik hastalık, nörotoksisite, üreme ve gelişimsel bozukluğun oluşumunda önemli bir risk oluşturmaktadır (25-27). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), yılda yaklaşık üç milyon kişinin kasıtsız olarak akut pestisit zehirlenmesine maruz kaldığını ve 346.000 kişinin öldüğünü; intihar amaçlı iki milyon pestisit zehirlenmesi vakası olduğunu ve bu vakaların, 370.000’in ölümle sonuçlandığını bildirmiştir (28).

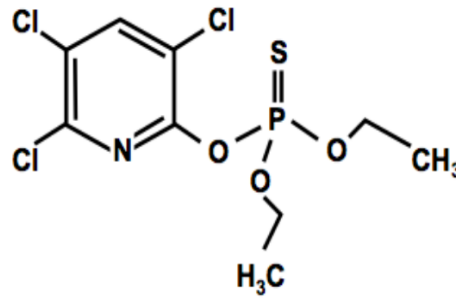
OP bileşiklerinin, halk sağlığı üzerindeki toksik etkilerinin aydınlatılması, bazı gelişmiş ülkelerin bu bileşiklerin kullanımına kısıtlamalar veya yasaklar getirmesine neden olmuştur. 2000 yılında ABD’deki Çevre Koruma Ajansı (EPA), çok toksik OP yapılı bir bileşik olan ve bu tezin odak noktasını oluşturan klorprifosun (CPF) evlerde kullanımını tamamen yasaklamış ve sadece tarım alanında kullanımına izin vermiştir. Tüm bu kısıtlamalara rağmen; CPF yaygın olarak kullanılan pestisit özelliğini korumakta olup, gelişmekte olan birçok ülkede, halen kullanımı devam etmektedir (29).

2.3. Klorprifos

İlk kez 1965 yılında Dow Elanco Firması tarafından sentezlenen ve ticari olarak üretilen ve geniş spektrumlu bir OP pestisit olan CPF, hamam böceği, pire, sığırlardaki kene ve hayvan barınaklarındaki zararlıları kontrol altına almak ve ayrıca tarım ve ormancılıkta çok çeşitli mahsulleri korumak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. CPF'nin alternatif ürünlerden çok daha etkili ve düşük maliyete sahip olması, bu bileşiğin kullanımını yaygınlaştırmaktadır (30).

2.3.1. Klorprifosun Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

CPF (*O,O*-dietil *O*-3,5,6-trikloropiridin-2-il-fosforotiyoat), merkaptan benzeri güçlü bir kokuya sahip renksiz kristalize bir pestisittir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Klorprifos kimyasal yapısı.

Apolar yapıya sahip CPF'nin suda çözünürlüğü (2 mg/l) oldukça azdır ve organik çözücülerde dağılma katsayısı ise (logP: 4,7-5,3) yüksektir (29). Bu yüzden, hayvanlara ve mahsüllere uygulanmadan önce genellikle benzen, aseton, kloroform, etanol, metanol, ksilen, dietil eter vb. organik çözücülerde çözülmemektedir (29, 31). Su içerisindeki stabilitesi sıcaklık ile değişen CPF'in sudaki hidroliz hızı, her 10 °C sıcaklık düşüşüyle 2,5-3 kat azalmaktadır. Hidroliz hızı, asidik ve nötr sularda sabit iken, alkali sularda artış göstermektedir. CPF'nin 25 °C'de ve pH 7,0 olan suda 35-78 günlük bir yarı ömrü bulunmaktadır (29).

CPF, toprak altında hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında bozunabilmektedir.

CPF, önce toksik olmayan 3,5,6-trikloro-2-piridinol'e (TCP), daha sonra organoklorin bileşiklerine ve en son olarak karbondioksit'e indirgenmektedir (30).

Ayrıca kendisinden 10 kat daha toksik olan klorprifos okson'a (CPO) da okside olabilmektedir (29, 32).

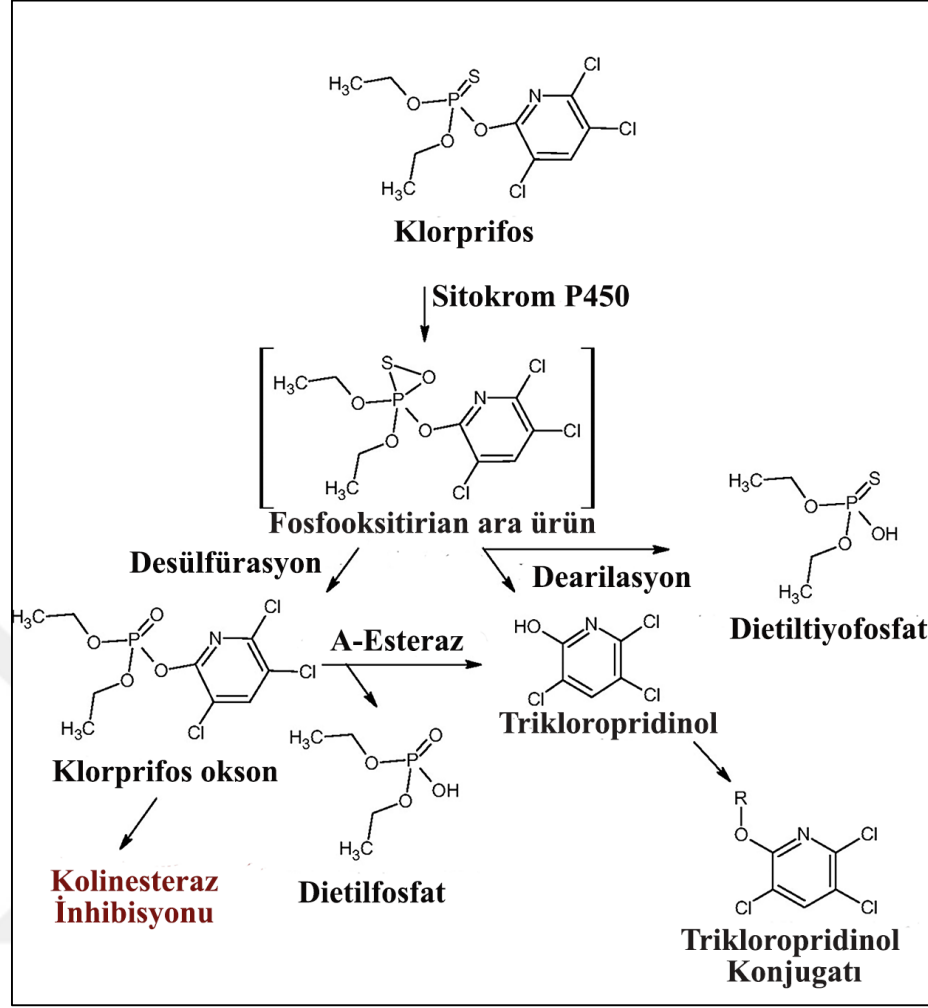
2.3.2. Klorprifosa Maruziyet

Genellikle CPF'nin kapalı alanlarda uygulanması ve tarım işçilerinin kullandığı bireysel koruma ekipmanlarının eksikliği ile CPF'ye akut maruziyet gerçekleşmektedir (33). Ayrıca, OP pestisit uygulanan bölgelerde yaşayan insanlar ve çocuklar da ciddi maruziyet riski taşımaktadır (21, 34). Yanlışlıkla veya isteyerek yutulması (intihar girişimi), pestisitlerin karıştırılması, yüklenmesi ve uygulanması sırasında dermal maruziyet veya kontamine yüzeylerle temas, başlıca maruziyet yollarıdır (35). Bununla birlikte, subkronik mesleki maruziyet ve genel popülasyonun CPF kalıntısı içeren diyet tüketimi, uzun süreli düşük doz CPF maruziyetine örnek olarak verilebilir (30).

CPF, uygulandıktan hemen sonra oral, inhalasyon ve dermal yollar ile absorbe olmaktadır. Lipofilik özelliklerinden dolayı, alveol, plesanta ve kan beyin bariyeri dahil olmak üzere lipid çift katmanlardan hızlıca geçebilmektedir (36, 37). CPF kan dolaşımına girdikten sonra sinir sistemindeki anahtar enzimlerden biri olan AChE'yi inhibe edebilecek ve nöron hasarını indükleyebilecek düzeyde dokulara dağılmaktadır (38). İdrar ile kolayca atılan degradasyon metabolitleri, maruziyetin biyobelirteçlerini tanımlamada potansiyel yarar sağlamaktadır (35, 39). CPF, konjugasyon ve esteraz aracılı hidroliz ile hızlıca karaciğerden metabolize edilerek idrar, dışkı ve solunum yolu ile atıldığı için insanlardaki yarı ömrü dakikalar veya saatler olacak şekilde oldukça kısadır (30).

2.3.3. Klorprifos Metabolizması

CPF absorbe olduktan sonra, AChE üzerinde inhibitör etkisini gösterebilmesi için, metabolik olarak fosfor atomuna çift bağlı sülfür atomunun (P=S) okside olması gerekmektedir (11, 40, 41). CPF, karaciğerde sitokrom P450 monooksijenaz sistemi ile oksidatif desülfürasyona uğrayarak, biyolojik olarak aktif formu CPO'ya dönüşmektedir (11, 29, 30) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Klorprifosun metabolik biyoaktivasyonu.

Ayrıca CPF, beyin mikrozomal sitokrom P450 ile de doğrudan CPO'ya okside olmaktadır, ancak bu dönüşüm hızı 100 kat daha azdır (42, 43). CPO, CPF'ye kıyasla, çok daha güçlü bir AChE inhibitörüdür (44). CPO, mikrozomal esterazlar (A-esteraz paroksonaz, klorprifos oksonaz) veya enzimatik olmayan hidroliz aracılığı ile özgül metabolitleri olan dietilfosfat ve TCP'ye dönüşmektedir. Alternatif olarak CPF, sitokrom P450 ile dearilasyona uğrayarak, TCP ve dietiltiyofosfat (DETP) oluşturmaktadır (45-47).

Karaciğer sitokrom P450 enzimlerindeki polimorfizmler, OP toksisite duyarlılığında değişikliğe neden olmaktadır (48). CPF metabolizması, insanlarda sitokrom P450 sisteminin birkaç izoformu tarafından gerçekleşmektedir. CPO oluşumunda, CYP2B6 ve CYP3A4 izoformları; TCP oluşumunda ise CYP2C19 izoformu önemli rol oynamaktadır (49-51). Her izozimin ekspresyon düzeyi, bireyler

arasında farklı olduğu için OP aktivasyon-detoksifikasyon hızı ve dolaşımdaki toksik OP seviyeleri bireyler arasında değişkenlik göstermektedir.

Sitokrom P450 enzimlerinin yanı sıra, CPO'nun katalitik hidrolizinde rol oynayan A-esteraz paroksonaz (PON-1) enziminin düşük seviyesi de, insanlarda ve hayvanlarda artan nörotoksik etki ile ilişkilendirilmektedir (52).

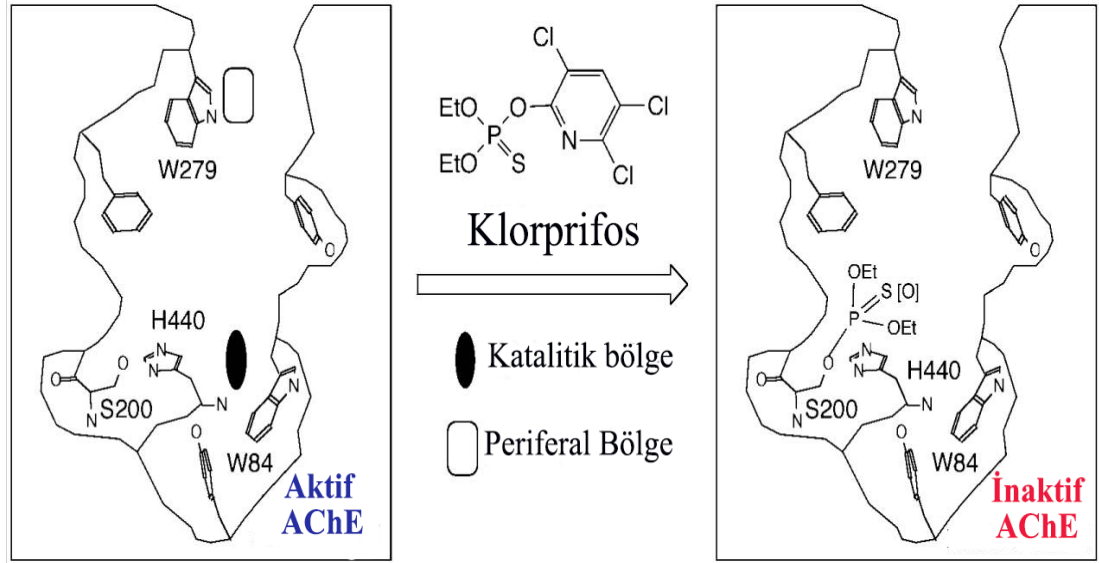
2.4. Klorprifos için Hedef Proteinler

2.4.1. Asetilkolinesteraz: Klorprifosun Birincil Hedefi

CPF'nin başlıca hedefi, periferik ve merkezi sinir sisteminde başlıca nörotransmitter, asetilkolinin (ACh) hidrolizinden sorumlu olan ve serin hidrolazlar ailesinin bir üyesi olan AChE'dir (11, 53, 54).

ACh'nin, postsinaptik muskarinik ve nikotinik reseptörlere bağlanması (55), beyin ve omurilikten bilginin iletilmesinde önemli rol oynamaktadır. AChE aktivitesinin inhibisyonu, nörotransmitter ACh'nin kolin ve asetata hidrolizini azaltmaktadır (56). Aşırı ACh birikimi, çeşitli klinik semptomlarla birlikte aşırı kolinerjik aktiviteye neden olmaktadır (12, 21, 57).

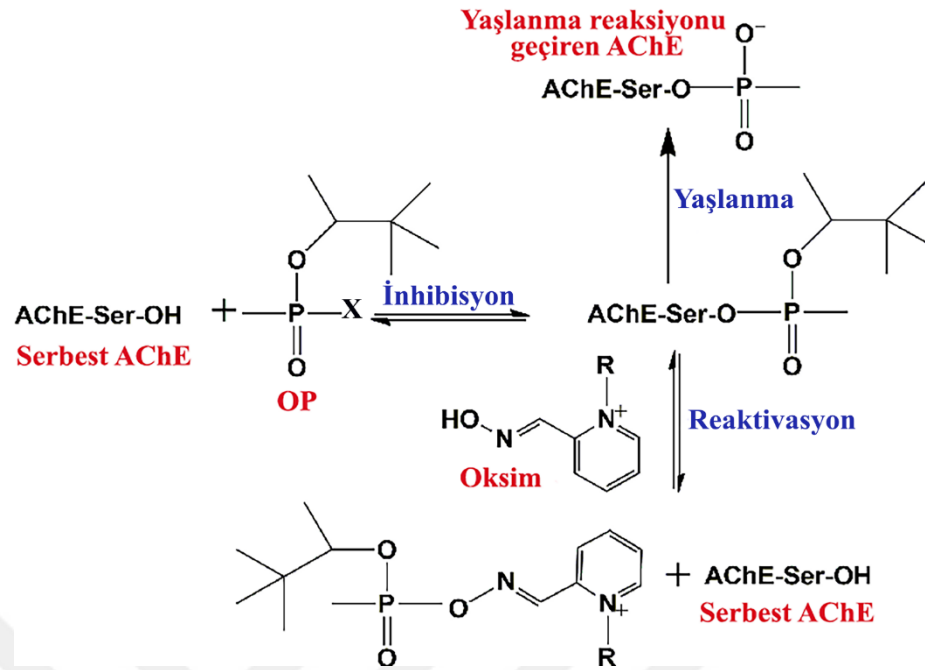
CPF'nin, AChE'yi inhibe edebilmesi için karaciğerde oksidatif desülfürasyona uğrayarak CPO'ya dönüşmesi gerekmektedir (11, 58, 59). CPO, AChE'nin aktif bölgesine (Şekil 2.3.) bağlandığında, CPO'nun fosfat grubu ile AChE'nin aktif bölgesinde bulunan serin amino asidinin hidroksil grubu arasında bir kovalent bağ oluşmaktadır.



Şekil 2.3. Asetilkolinesterazın aktif bölgesindeki katalitik serinin klorprifos ile konjugasyonu.

AChE'nin esteratik bölgesi ile fosfor atomu arasındaki bağ, aynı enzim bölgesinde ACh içerisindeki karbonil karbonu arasındaki bağa kıyasla çok daha karardır. Karbon-enzim bağının kırılması mikrosaniyeler içerisinde gerçekleşirken, fosfor-enzim bağının kırılması, birkaç saat ile birkaç gün arasında sürebilmektedir (60, 61). Bazı durumlarda, AChE inhibisyonundan birkaç saat sonra, AChE-CPO arasındaki bağın spontan hidrolizi ile AChE yeniden aktive olmaktadır. Bu reaksiyon oldukça yavaş hızda gerçekleşmektedir (62).

Oksimler olarak bilinen bazı hidroksilamin türevleri, AChE'nin anyonik bölgesine bağlanabilen ve enzimin defosforilasyonunu kolaylaştırabilen pozitif yüklü bir atom içermektedir (Şekil 2.4). Böylece enzimin spontan olarak yeniden aktivasyonu, oksim gibi nükleofilik reaktifler ile gerçekleşebilmektedir. (11, 63). Oksimler, OP zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılmaktadır (11, 64, 65). AChE, CPO ile inhibe olduğunda, AChE-CPO kompleksinde, CPO üzerinde bulunan dietoksi (R_1 , R_2) gruplarından biri ayrılmaktadır. Enzimatik olmayan bu reaksiyon, yaşlanma (aging) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.4). Yaşlanma reaksiyonunun gerçekleşmesi ile enzim yeniden aktive olmaya direnç kazanmaktadır çünkü dealkile olan negatif yüklü fosforil grubu daha karardır ve enzim tersinmez olarak inhibe edilmektedir. Bu durumda yeni AChE moleküllerinin sentezlenmesi gerekmektedir (44, 60, 66).



Şekil 2.4. Asetilkolinesterazın OP yapıları tarafından inhibisyonu, yaşlanma reaksiyonu ve nükleofilik ajan aracılığıyla reaktivasyonu.

Akut kolinerjik sendrom

CPF'nin akut toksik etkisi, OP yapıları bileşiklerin primer farmakolojik hedefi olan AChE'nin inhibisyonu ile gösterilmektedir. AChE'nin inhibisyonu ile periferik sinirlerin sinapslarındaki aşırı ACh birikimi, merkezi ve periferik sinir sistemlerinde, kolinerjik (nikotinik ve muskarinik) reseptörlerin aşırı uyarılmasına neden olmaktadır (67).

Toksik CPF'ye maruziyet ile biriken ACh, muskarinik reseptörlere bağlanmakta ve bronkokonstriksiyon, hipotansiyon, miyozis, kalp atışının düşmesi, artan terleme, aşırı tükürük salgısı gibi muskarinik etkiler gözlenmektedir (68). Akut kolinerjik sendrom, CPF maruziyetinden sonra birkaç dakika ile birkaç saat arasında çok hızlı bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Ancak bazı durumlarda klinik bulgular bir gün sonrasında da gözlenebilmektedir (31). Bu evrede hipertansiyona, kontrolsüz kas kaspılmalarına, felce neden olan nikotinik reseptörler uyarılmaktadır (68). Solunum kaslarının paralizi ile solunum yetmezliği ve kardiyak arreste bağlı olarak ölüm, çok kısa sürede gerçekleşebilmektedir (13, 57). Ayrıca CPF zehirlenmesi ile konuşma bozukluğu, baş ağrısı, uykusuzluk, spazm, konvülsiyon, koma vb. merkezi sinir sistemi belirtileri de ortaya çıkabilmektedir (69, 70).

Akut CPF toksisitesinin tedavisinde iki strateji izlenmektedir. Bunlardan ilki, atropin gibi kolinerjik muskarinik antagonist kullanımı ile muskarinik reseptörleri bloke etmektir. Diğer strateji ise oksim, pralidoksim gibi spesifik antidotların uygulanması ile AChE'nin yeniden aktive olmasını sağlamak ve böylece ACh birikimini önlemektir (71). Ancak yaşlanma reaksiyonu sonrasında AChE, oksimler tarafından aktive edilememektedir (31).

2.4.2. Nöropati Target Esteraz

Nöropati target esteraz (NTE), endoplazmik retikulum membranına bağlı fosfatidilkolinin, gliserofosfokolin ve yağ asitlerine dönüşümünü katalizleyen bir fosfolipazdır. NTE mutasyonları (72) veya bir OP'nin NTE'ye kovalent bağlanmasının neden olduğu yapısal değişiklikler, fosfatidilkolin birikimine yol açmaktadır. Bunun sonucunda membran yapısı değişmekte, glia-akson etkileşimi ve aksonal transport bozulmakta ve son olarak hücre ölümü gerçekleşmektedir (73).

Toksik metabolit krezil saligenin fosfatın (CBDP) öncüsü olan OP yapılı bileşiklerden tri-orto-krezil fosfat ile zehirlenen insanlarda, bacak ve omurilikteki uzun sinirlerin distal uçları şişmekte ve dejenere olmaktadır (74). Sinirlerde gerçekleşen hasardan kaynaklanan felç, OP kaynaklı gecikmiş polinöropati (OPIDN) olarak adlandırılmaktadır. Beyin NTE aktivitesinin yaklaşık % 70'inin geçici olarak inhibisyonu, birkaç hafta sonra klinik nöropatiye neden olmaktadır (75). Nöropatik OP bileşikleri, yaşlanma reaksiyonu sonrasında NTE üzerinde negatif yüklü eklenti ürünleri oluşturmaktadır.

ABD'de yasadışı üretilen likörlere eklenen tri-orto-krezil fosfatın, *ginger jake* felcine neden olduğu rapor edilmiştir (76). Tri-orto-krezil fosfatın toksik bir metaboliti olan CBDP, AChE'nin etkili bir inhibitörü değildir (77). Bu nedenle, insanlarda kolinerjik kriz görülmeden önce polinöropati gelişmektedir.

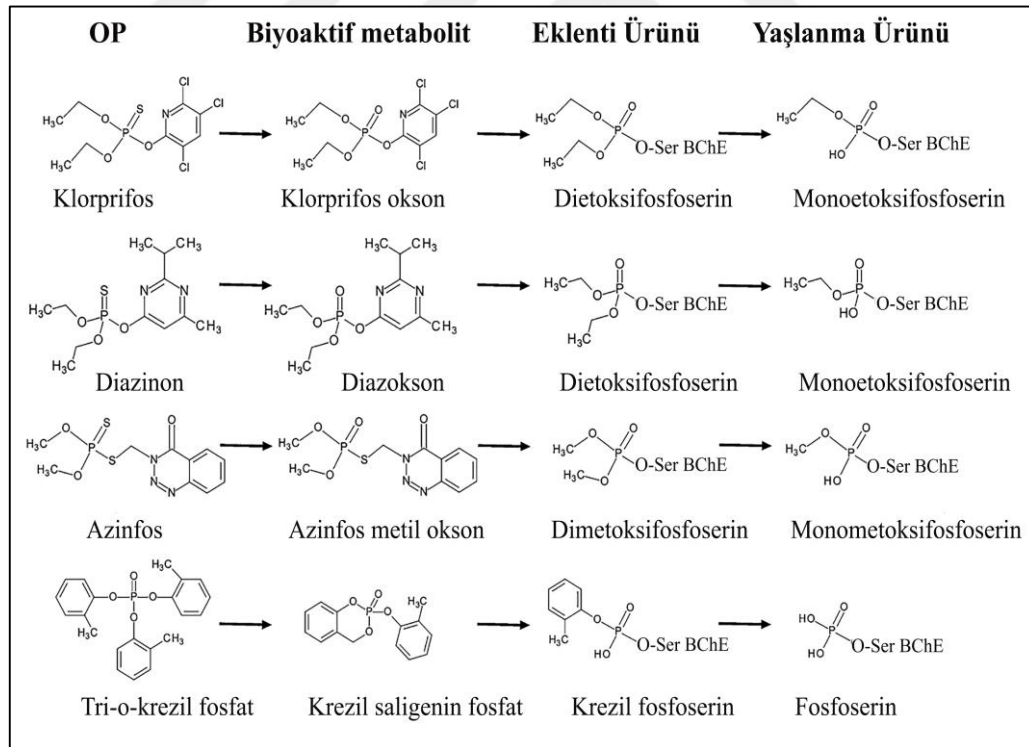
Sonuç olarak, nöronlarda NTE, kolinesterazlardan bağımsız olarak insanlarda OP toksisitesinin ikinci bir hedefi olarak gösterilmektedir.

2.4.3. Bütirilkolinesteraz

BChE, insan plazmasında ve serumda bulunan, tetramerik yapıda bir kolinesterazdır. 340 kDa ağırlığındaki BChE tetrameri, dimerin dimeridir ve her dimer, birbirine Cys 571'den disülfid bağı ile bağlanmaktadır. Her bir alt ünite, 574

amino asit ve dokuz adet Asn bağı karbonhidrat zinciri içermektedir (78). İnsan kanında BChE düzeyi, AChE'den on kat daha fazla olup (79), insan serumu yaklaşık 4-5 mg/l BChE ve 0.5 mg/l AChE içermektedir. BChE, plazmada; AChE ise kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin membranlarına bağlı olarak bulunmaktadır. BChE, OP yapılı bileşikler ile oldukça reaktiftir ve OP pestisitlerinin çoğu, AChE'a göre BChE ile daha hızlı reaksiyon göstermektedir (56). Ayrıca kandaki BChE aktivitesinin inhibisyonu, spektrofotometrik analiz ile kolayca ölçülebilmektedir. İnsanlarda BChE aktivitesinin inhibisyonunun, hiçbir yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ancak, AChE *knock out* farelerde BChE aktivitesinin inhibe edilmesi, hayvanların ölümüne neden olmaktadır (80, 81). OP'ler, AChE'de olduğu gibi, BChE'nin aktif bölgesi üzerinde kovalent modifikasyona neden olmaktadır (Şekil 2.5.).

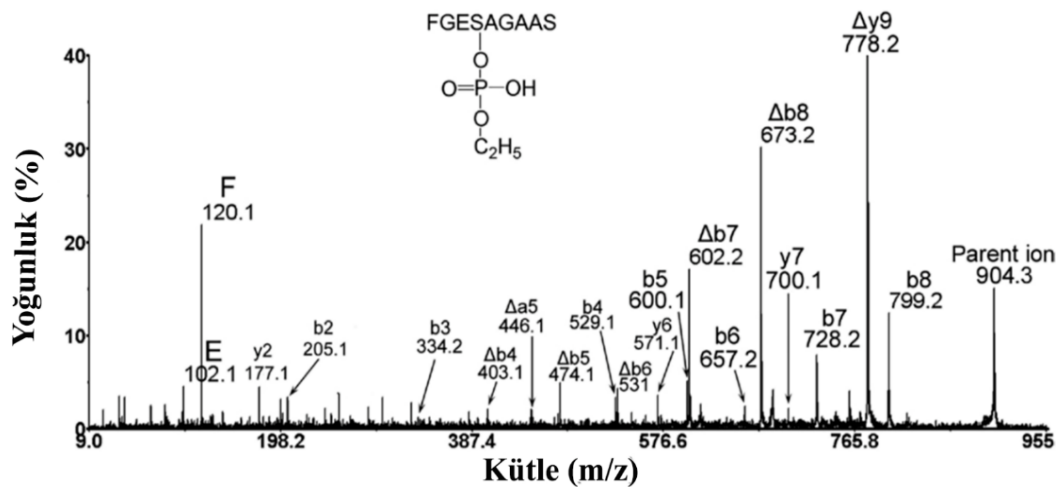
BChE'deki OP eklentilerini tanımlamak için kütle spektrometri yöntemleri geliştirilmiştir (82, 83). Tüm bu özellikler OP maruziyetinin teşhisinde BChE'yi tercih edilir bir biyobelirteç yapmaktadır.



Şekil 2.5. OP bileşiklerin biyoaktivasyonu ve BChE ile etkileşimi.

OP-BChE eklenti ürünlerinin tanımlanması

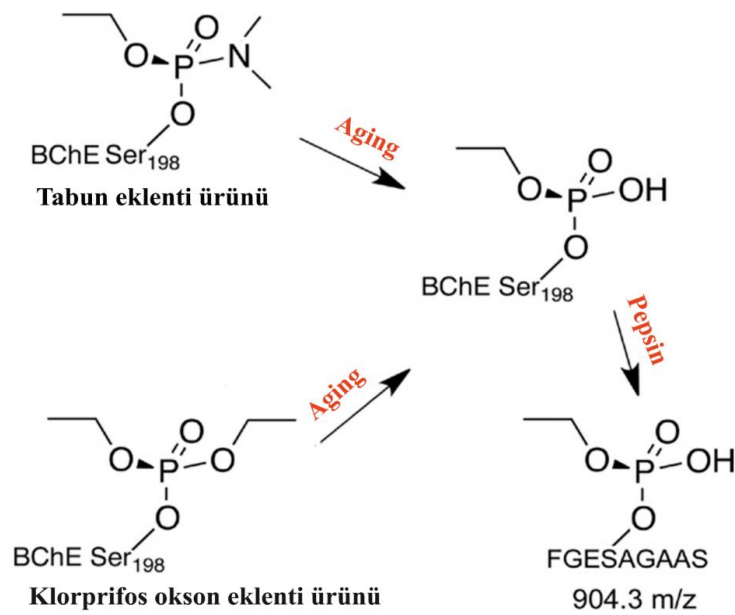
Fidder ve arkadaşları, OP maruziyetini BChE üzerinden elektrosprey-iyonlaşma tandem kütle spektrometri kullanarak tanımlamışlardır (82). Böylece, Tokyo metro saldırısında OP'ye maruz kalan kişilerden alınan plazmalarda, BChE aktif bölgesinde oluşan eklenti ürünlerinin kütlesi ölçülmüş ve BChE aktif bölge peptidinin kütlesinin, OP ile modifiye edilmemiş BChE aktif bölge peptidine göre 120 atomik kütle birimi daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu kütle farkının sarinden kaynaklı olduğu düşünülmüştür. MS/MS fragmentasyonu ile peptit dizileri tanımlanmış ve OP ile modifiye olan amino asidin, BChE aktif merkezindeki Ser198 olduğu, gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda ayrıca OP maruziyetinin kütle spektrometri ile analizi için iki önemli teknik detay tanımlanmıştır. Bunlardan ilki, OP maruziyeti için BChE aktif bölgesine ait peptit dizisi belirlenirken pepsin kullanımının, tripsine göre avantajlı olmasıdır. Diğer teknik detay ise, çarpışmanın neden olduğu ayrıştırma sırasında, OP ile modifiye BChE aktif bölge serin üzerinde, eklenti ürünlerinin ve bir su molekülü çıkışı ile serinin dehidroalanine dönüşmesidir. BChE'nin pepsin ile parçalanması sonucunda 9 amino asitten oluşan FGES₁₉₈AGAAS aktif bölge peptit dizisi elde edilirken, tripsin ile parçalanma sonucunda 29 amino asitten oluşan SVTLFGES₁₉₈AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR peptit dizisi gözlenmektedir (84). Şekil 2.6., pepsin ile parçalanan OP-modifiye insan BChE'ye ait FGES₁₉₈AGAAS peptidinin MS/MS spektrumunu göstermektedir.



Şekil 2.6. OP ile modifiye insan BChE aktif bölge peptidinin MS/MS spektrumu (84).

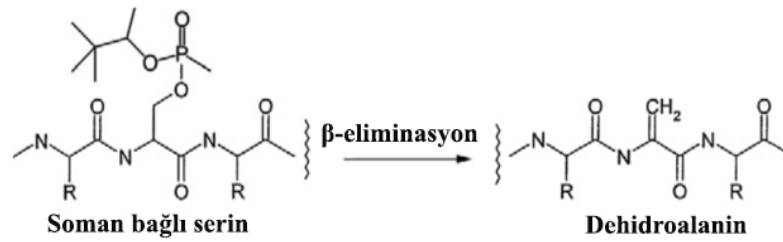
OP maruziyeti olmadığında, BChE aktif bölge FGESAGAAS peptidi için kütle spektrometri ile 796.3 m/z kütle gözlenmesi beklenmektedir. Şekil 2.6'da ana iyon olarak 904.3 m/z kütle gözlenmektedir. 904.3 m/z ve 796.3 m/z arasındaki 108 Da'luk kütle farkı ve peptit fragmentasyonu, BChE'nin aktif bölgesindeki serinin monoetoksifosfat ile modifiye olduğunu düşündürmektedir. Serin amino asidi üzerinde oluşan monoetoksifosfat eklenti ürünü (+108 Da), kolinesterazların dietoksifosfat (+136 Da) yan grubu taşıyan OP bileşikler ile maruziyeti sonrasında gerçekleşen yaşlanma reaksiyonu sırasında bir etil yan grubunun dealkile olması (-28 Da) ile meydana gelmektedir.

Şekil 2.6.'da dizilenen peptit, pepsin ile parçalanan ve aktif bölge serin amino asidi üzerinde monoetoksifosfat ile modifiye, insan AChE (Swiss protein #P22303), insan BChE (Swiss protein #P06276) ve at BChE (NCBI #gi7381418) için aynı FGESAGAAS aktif bölge peptidini vermektedir (82). Monoetoksifosfat modifikasyonu, dietoksifosfat yan grubuna sahip sinir ajanı tabun ile oluşabileceği gibi, CPF, dietil paraokson, diazokson gibi dietoksifosfat yan grubu taşıyan OP pestisitlerin yaşlanma reaksiyonu ile de oluşabilmektedir (Şekil 2.7.). Sinir ajanı tabun, yaygın olarak kullanılan dietoksifosfat pestisitlerinden ayırt edilemeyen bir eklenti ürünü oluşturmaktadır (82, 84).



Şekil 2.7. Pepsin ile parçalanan OP ile modifiye BChE.

Kütle spektrometri ile MS/MS spektrumları elde edilirken, OP ile modifiye olan BChE aktif bölge serin amino asidinin büyük bir kısmı dehidroalanine dönüşmektedir. Şekil 2.6.'da Δ sembolü ile işaretlenmiş tüm iyonlar, OP maruziyeti sonrası, OP eklenti ürünlerini ve bir su molekülü kaybeden aktif bölge serinin, dehidroalanine dönüşümünü ifade etmektedir (82, 84). OP ile modifiye serinin dehidroalanine dönüşmesi beta eliminasyon olarak adlandırılmaktadır (85). Şekil 2.8., insan BChE'sinde soman ile modifiye serin için beta-eliminasyon reaksiyonunu şematik olarak göstermektedir.



Şekil 2.8. Soman ile modifiye serin için beta-eliminasyon reaksiyonunun şematik diyagramı.

OP-serin bağının, çarpışma kaynaklı ayrışma sırasındaki kırılma kolaylığı, Şekil 2.6.'deki en yoğun iyonun $778.2 m/z$ olması ile gösterilmektedir. $778.2 m/z$ 'deki peptit, dealkile ve bir su molekülünü kaybeden ana iyonu ifade etmektedir. Beta eliminasyon reaksiyonu geri dönüşümsüzdür (84).

2.4.4. Serin Hidrolazlar

Doku homojenatları ve saflaştırılmış enzimlerle yapılan *in vitro* çalışmalar, tüm serin proteazlar ve serin esterazların OP yapılı bileşikler ile kovalent bağ oluşturduğunu ve bu durumun enzim aktivitesinin inhibisyonu ile sonuçlandığını göstermektedir. *In vitro* deneylerde, hayvanlardaki ölümcül dozu aşan yüksek konsantrasyonlarda OP kullanılmaktadır.

Serin hidrolazların aktif bölgesinde bulunan serin için GlySerGly konsensüs dizisi bulunmaktadır. OP ile *in vitro* inhibe edilen serin proteazlara örnek olarak; tripsin, kimotripsin, karboksilesteraz, trombosit aktive edici faktör asetilhidrolaz, fosfolipaz A₂, doku plazminojen aktivatörü, trombin ve yağ asidi amid hidrolaz verilebilir (86). OP pestisitlerinin letal olmayan dozları ile muamele edilen canlı

hayvanlarda, plazma karboksilesteraz haricindeki bu enzimler inhibe edilmemektedir. Karboksilesteraz, farelerin, sıçanların, kobayların ve tavşanların, plazmasında bulunmaktadır, ancak maymunların ve insanın kanında yoktur (87). İnsanlarda OP'nin letal olmayan dozları ile inhibe edildiği bilinen serin hidrolazlar; AChE, BChE ve NTE'dir (88).

2.4.5. Düşük Doz OP Maruziyeti

Hindistan'da OP pestisit, *quinalphos* üretiminde çalışan işçilerde ($n=59$), alyuvar AChE aktivitesi normal iken, yorgunluk ve halsizlik şikayetleri ile birlikte hafıza ve öğrenme yeteneklerinde anlamlı derecede bir azalma gözlenmiştir. Yaş ortalaması, 30 ± 6 olan işçiler, yeterli havalandırma sağlanamayan alanda *quinalphosa* 5.7 yıl boyunca maruz kalmıştır (89).

Brezilya'da tütün çiftçileri ($n = 37$), yılın 3 ayı günde 5.4 saat klorprifos ve aseptat kullanarak 18 yıl boyunca OP pestisite maruz kalmıştır. Plazma kolinesteraz aktiviteleri normal sınırlardayken, pestisit uygulaması sırasında 12 denekte ekstrapiramidal semptomlar gözlenmiştir. 13 denek için genel anksiyete bozukluğu, 8 denek için majör depresyon tanısı konulmuştur (4). Hikayelerinde akut zehirlenme bulunmayan işçilerde gözlenen semptomlar, düşük doz OP maruziyetini düşündürmüştür.

Düşük dozlardaki OP toksisitesinin mekanizmasını aydınlatmak için birçok *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, AChE aktivitesini etkilemeyen çok düşük dozlardaki OP'lerin, adenilat siklaz sinyalizasyonunda (90) ve lipit metabolizmasında bozulmalara (91), kalsiyum/siklik adenozin monofosfat (cAMP) yanıt elementi bağlanma proteininin hiperfosforilasyonuna (92), beyindeki fibroblast büyüme faktörünün ekspresyon düzeylerinde (93) ve serotonin reseptörlerinde değişikliğe (94) ve açilpeptit hidrolazın inhibisyonuna (5) neden olduğunu göstermiştir. Bu durum, OP'lerin AChE ve BChE dışında başka hedeflerinin olduğunu ve düşük doz OP maruziyetinde, bu hedef proteinlerin kronik nörotoksistide rol aldığını düşündürmektedir.

2.4.6. Diğer Klorprifos Hedefleri

AChE'ye ek olarak OP hedeflerine ilişkin kanıtlar, Virginia Moser tarafından sağlanmıştır. Virginia Moser tarafından yapılan bir araştırma sonucunda, yüksek

dozlardaki OP'lerin kimliklerinden bağımsız olarak benzer kolinerjik etkiler gösterdiği daha düşük dozlardaki OP'lerin ise farklı etkilere neden olduğu rapor edilmiştir (95). Örneğin, 100 mg/kg CPF, sıçanların %100'ünde tremora neden olurken, aynı dozdaki diazinon ile tremor gözlenmemiştir (95). Bununla birlikte, davranışsal belirtilerin, belirli bir AChE inhibisyon seviyesi ile ilişkili olmadığı da gösterilmiştir. CPF'nin uygulanması sonrasında ortaya çıkan davranışsal belirtiler, beyindeki AChE aktivitesinin % 70'inin inhibe edilmesiyle gözlenirken, aynı belirtiler paraokson ile AChE aktivitesinin % 30'u inhibe edildiğinde gözlenmiştir. AChE aktivitesi normale döndükten sonra uzun dönem davranışsal belirtiler devam etmektedir (96). Ayrıca, beyinde benzer oranlarda AChE inhibisyonunu tetikleyen CPF veya paratyon dozları ile muamele edilen sıçanlarda, paratyon ile CPF maruziyetine göre daha fazla toksisite belirtileri gözlenmiştir (97).

802 hasta üzerinde yapılan bir araştırmada, yaygın kullanılan OP bileşiklerin klinik özellikleri karşılaştırılmıştır (98). WHO tarafından orta derecede tehlikeli olarak sınıflandırılan CPF, dimetoat veya fentiyon bileşiklerine maruz kalan hastalarda mortalitenin, CPF'e göre (% 8.0) dimetoat (% 23.1) ve fentiyon (% 16.2) ile zehirlenen hastalarda daha yüksek olduğu gözlenmiştir (99). Tüm bu çalışmalar, OP bileşiklerinin alternatif olarak kolinesterazlar dışındaki hedefler ile etkileşime girdiğini ve bu hedeflerin OP kimliğine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (95, 98).

2.4.7. Beta Glukronidaz

*Egasy*n olarak adlandırılan ve sıçan karaciğeri mikrozomlarında bulunan karboksilesteraz, bir kompleks tarafından beta-glukuronidaza (BG) sıkıca bağlanmaktadır. *Egasy*n, OP'ye bağlandığında, BG kana salınmaktadır (100).

Yapılan bir çalışmada, oral olarak tek seferde verilen klorprifosun (10 mg/kg) sıçan kanında BG aktivitesini 2 saat içinde 100 kat arttırdığı gözlenmiştir (100). Bu durum, BG'nin OP maruziyetinin teşhisinde bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür. Ancak plazma BG aktivitesindeki artış, diğer hayvan türlerinde ve insanlarda doğrulanamamıştır (101).

2.4.8. Açılpeptit Hidrolaz

Beyin, karaciğer ve kırmızı kan hücrelerinde bulunan açılpeptit hidrolaz enzimi, küçük asetillenmiş peptitlerden N-terminal asetillenmiş amino asitlerin

hidrolizini katalizlemektedir (102, 103). AChE üzerinde etkin olmayan dozlardaki diklorvos, DFP ve metil klorprifos oksonun, açılpeptit hidrolaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Açılpeptit hidrolazın bu OP bileşiklere duyarlılığı (IC₅₀), AChE'ye göre 6-10 kat daha fazladır (5).

Kolinerjik toksisiteye neden olmayan bir dozda, diklorvos ile muamele edilen sıçanların, beyin AChE aktivitesinin % 47'sinin ve beyin açılpeptit hidrolaz aktivitesinin % 93'ünün inhibe edildiği bulunmuştur (5). Bu durum, belirli bir OP pestisitine maruziyetin teşhisinde açılpeptit hidrolazın duyarlı bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, intraperitoneal olarak verilen DFP ile kandaki açılpeptit hidrolaz aktivitesinin hemen hemen tamamı inhibe edildikten sonra farelerde toksik belirtiler gözlenmemiştir, bu da açılpeptit hidrolazın akut OP toksisitesinde bir role sahip olmadığını düşündürmektedir (103). Bununla birlikte açılpeptit hidrolaz, oksidatif hasar görmüş proteinlerin bozunmasında rol oynamaktadır. Bu nedenle enzimin kronik OP toksisitesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (104, 105). Ayrıca açılpeptit hidrolazın 120 günlük yaşam süresine sahip insan eritrositlerinde bulunması, OP maruziyetin belirlenmesi için bir avantaj sağlamaktadır (103, 106, 107).

2.4.9. Reseptörler

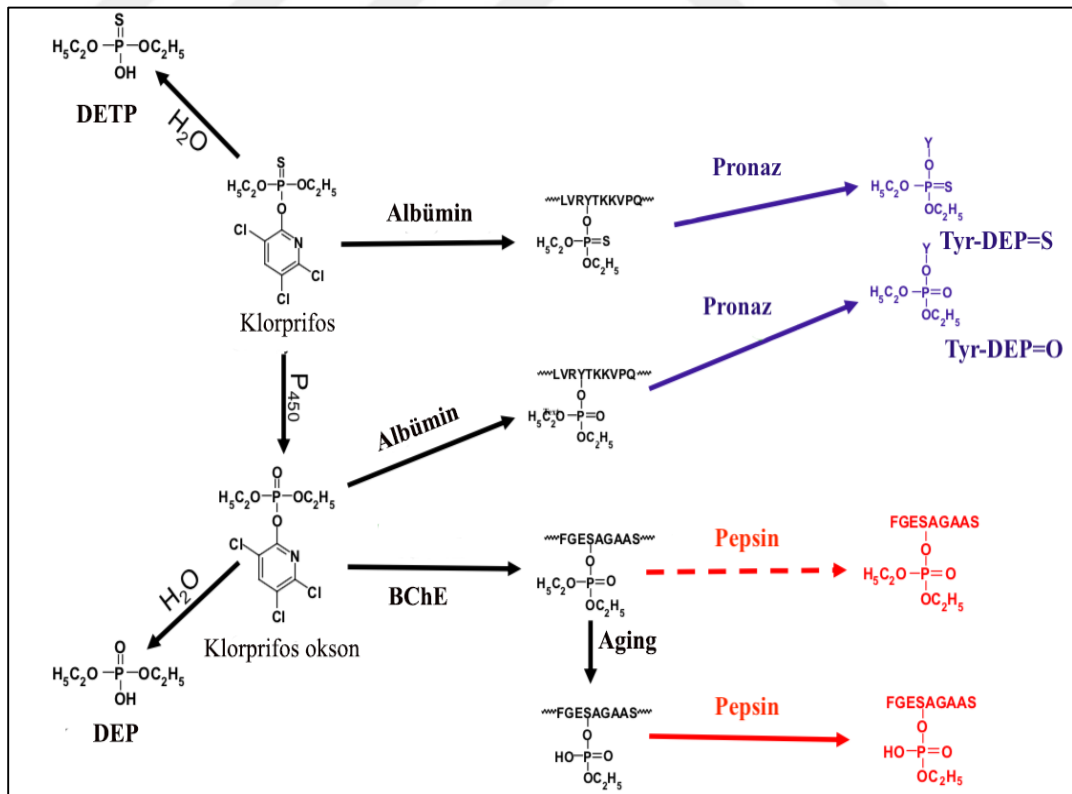
CPO'nun, M2 muskarinik reseptörüne bağlanarak, hücre sinyalizasyonunu dolayısıyla nörolojik fonksiyonu etkilediği ve bunu AChE inhibisyonundan bağımsız bir nörotoksosite mekanizmasını tetikleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir (108). ³H-klorprifos oksonun, sıçanlarda kalp M2 muskarinik reseptörlerine kovalent olarak bağlandığı rapor edilmiştir ancak bağlanma bölgesi tanımlanmamıştır (109).

Ayrıca, kobaylar ile yapılan çalışmada, CPF, paratyon ve diazinonun AChE aktivitesini inhibe etmeden, nöronal M2 reseptör fonksiyonunu inhibe ettiği ve bronkokonstriksiyona neden olduğu gösterilmiştir (110).

Kannabinoid reseptörlerin, kardiyak adrenerjik reseptörlerin, kolinerjik otreseptörlerin ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerin OP ile *in vitro* etkileştiği gösterilmiştir (1). Ancak reseptör-OP etkileşimi tersine çevrilebilmektedir, bu da OP maruziyetinin ve OP eklenti ürünlerinin tanımlanmasını olanaksız kılmaktadır.

2.4.10. Albümin

Yapılan çalışmalar sonucunda biyotin ile işaretli florofosfatın (FP) toksik olmayan dozu ile muamele edilen farelerin kanında ve kasında FP-biyotinlenmiş albümin gözlenmiştir (17). Bununla birlikte *in vitro* deneyler ile OP'lerin albümine Tyr411'den kovalent olarak bağlandığı gösterilmiştir (111). Soman, sarin, siklosarin ve tabun gibi OP sinir ajanları ile muamele edilen kobayların kan örneklerinin kütle spektrometre ile analizi sonucunda; albüminin sinir ajanları ile modifiye olduğu gösterilmiştir ve bu modifikasyonların da tirozin amino asidi üzerinden gerçekleştiği rapor edilmiştir. Tirozin üzerinde oluşan tabun ve soman eklentileri, maruziyetten 7 gün sonra kanda gözlenmiştir. Ayrıca bu kobaylar, AChE üzerinde oluşan OP eklenti ürünlerinin salınmasında yaygın olarak kullanılan oksim ile muamele edildiğinde; tirozin-OP eklenti ürününün yaşlanma reaksiyonuna uğramadığı ve OP eklenti ürünlerinin salınmadığı saptanmıştır. Bu gözlem, oluşan tirozin-OP eklenti ürünlerinin stabil olduğunu göstermektedir (Şekil 2.9.) (8). Bu nedenle albümin, OP maruziyetinin tanımlanmasında yararlı bir biyobelirteçdir.



Şekil 2.9. CPF ve CPO'nun albümin ve BChE üzerindeki eklenti ürünleri.

Literatürde, OP ile modifiye albümin için 3 farklı hasta örneği vakası bulunmaktadır (6, 112, 113). Diklorvos kullanarak intihar girişiminde bulunan iki hastada, albümindeki Tyr411'den dimetoksifosfat eklenti ürününün olduğu saptanmıştır. Hastaların serum örneği pepsin ile fragmanlara ayrılmış ve OP ile modifiye peptitler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örnekler kütle spektrometri ile analiz edildiğinde; dimetoksifosfat ile modifiye **VRY₄₁₁TKKVPQVSTPTL** ve **LVR_{Y411}TKKVPQVSTPTL** albümin peptitleri tanımlanmıştır (112). İkinci vaka çalışması, CPF ve diazinon ile intihar girişiminde bulunan iki kişinin plazma analizi ile gerçekleşmiştir. HiTrap mavi afinite kolonu ile saflaştırılan plazma albümini pronaz ile parçalanmıştır. Kütle spektrometri ile yapılan analiz sonucunda, tirozin amino asidinin dietoksifosfat ve dietiltiyofosfat ile modifiye olduğu gözlenmiştir (6). Üçüncü vaka çalışmasında ise CPF ile intihar girişiminde bulunan beş hastadan alınan plazma, pronaz ile parçalandıktan sonra HPLC ile saflaştırılmıştır. MALDI-TOF ile analiz sonrasında, gözlenen 318 Da'luk kütle, dietoksifosfat (+136 Da) ile modifiye tirozin amino asidininin (182 Da) varlığını göstermiştir (113).

2.4.11. Tübülün

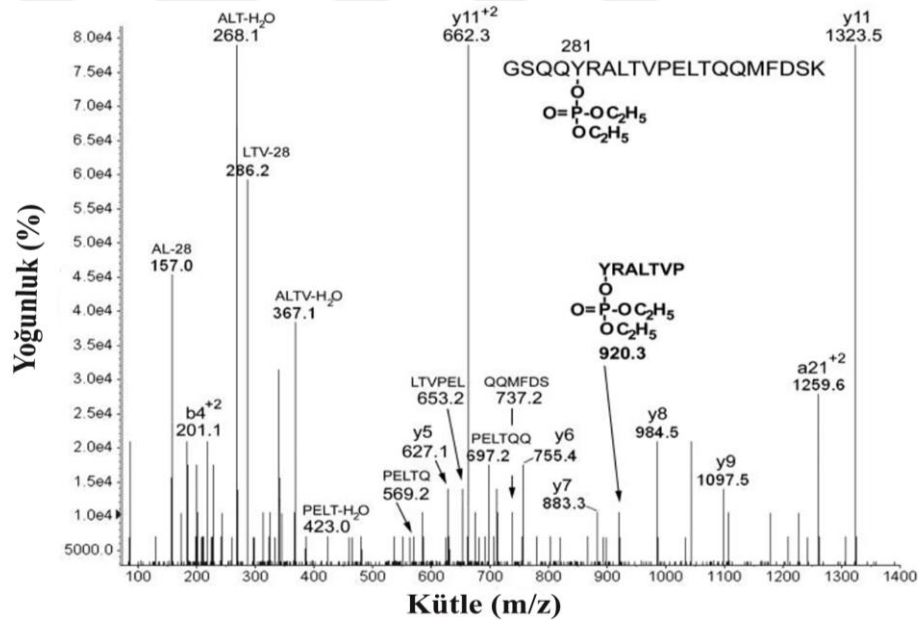
Asetilkolinesteraz inhibisyonunun gözlenmediği düşük dozlardaki OP'ye maruziyet, bazı kişilerde kognitif bozukluklara neden olmaktadır. Epidemiyologlar, düşük dozlardaki kronik OP maruziyetini Parkinson hastalığı, nörolojik fonksiyon bozukluğu, Körfez Savaşı Hastalığı (114) ve depresyon ile ilişkilendirmektedir (3, 114-116). Bununla birlikte, AChE'yi inhibe etmeyen dozlardaki CPO'nun, embriyonik sıçan servikal gangliyon sempatik nöronlarında nörit büyümesini azalttığı gösterilmiştir (117).

Albüminin OP yapılı bileşikler ile kovalent etkileşime girmesi, düşük dozlarda gözlenen OP toksisitesini açıklayamamaktadır. Bununla birlikte, OP bileşiklerin albümindeki tirozin amino asidine kovalent bağlanması, serin hidrolazlardan başka proteinlerin de düşük dozdaki OP toksisitesine neden olabileceğini düşündürmektedir.

Tübülün, kronik OP toksisitesi için aday protein olarak gösterilmektedir. Tübülün mikrotübüllere polimerize olmaktadır ve mikrotübüller de, aksonal transport için önemli rol oynamaktadır (10). Sıçanlarda yapılan davranış çalışmaları, düşük doz

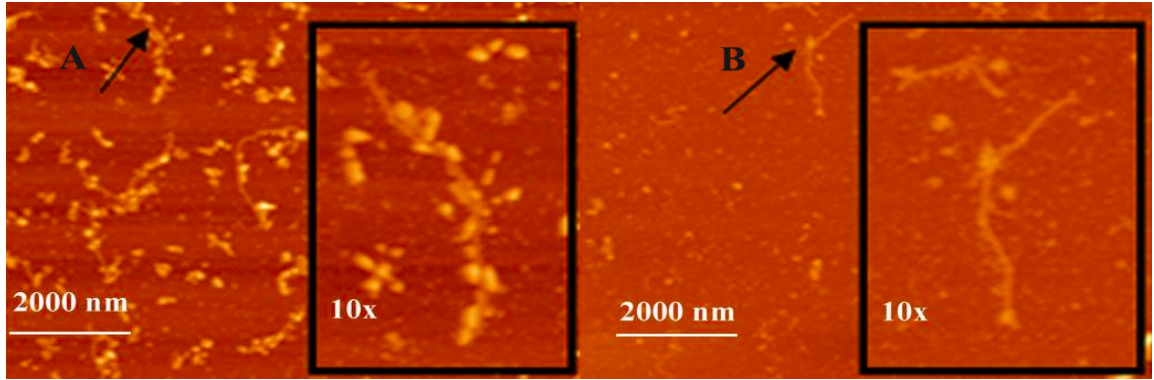
CPF'nin kronik maruziyetini aksonal transport harabiyeti ve bilişsel bozukluk ile ilişkilendirmektedir (118, 119). Saf sığır tübülünü ile yapılan çalışmalar, tübülünün, CPO, soman, sarin, diklorvos ve FP-biyotin ile kolayca modifiye olduğunu ve oluşan dietoksifosfat eklenti ürünlerinin lizin ve tirozin amino asitleri üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir (120, 121).

Saf proteinler kullanılarak elde edilen sonuçların, canlı hayvanlardaki olası durum ile ilişkili olup olmadığını göstermek amacıyla fareler, kolinerjik belirtilerin gözlenmediği dozda CPF ile muamele edilmiş ve fare beyinlerinden saflaştırılan tübülün, kütle spektrometri ve atomik kuvvet mikroskobu ile analiz edilmiştir (122). Kütle spektrometri sonuçları, beta tübülüne ait GSQQY²⁸¹RALTVPELTQQMFDSK peptidindeki Tyr²⁸¹ üzerinden dietoksifosfat eklenti ürünlerinin varlığını göstermiştir (Şekil 2.10.) (123).



Şekil 2.10. OP ile modifiye beta tübülünü tanımlayan MS/MS spektrumu (123).

Atomik kuvvet mikroskobu ile edilen sonuçlar ise, azalan uzunluk ve genişliğe sahip mikrotübüle daha az bağlı proteinler ile karakterize, anormal bir mikrotübül yapısını göstermektedir (Şekil 2.11.) (123).



Şekil 2.11. Fare beyinde anormal mikrotübül yapısını gösteren atomik kuvvet mikroskobu görüntüsü. (A) Kontrol fareye ait mikrotübüllerin görüntüsü. Mikrotübüller birçok protein ile bağlantılıdır. (B) İntraperitoneal olarak CPO (3 mg/kg) ile muamele edilen fareye ait mikrotübüllerin görüntüsü. Mikrotübüller daha az protein ile ilişkilidir (123).

Hücre gövdesinden aksona hücre bileşenlerinin taşınmasında, tübülün ve bununla ilişkili proteinler önemli bir role sahip olduğu için, tübülün kronik OP toksisitesinde biyobelirteç olarak rol oynayabileceği düşünülmektedir (123).

2.5. Tirozin

1963 yılında Sanger, insan ve tavşan albümininin ArgTyrThrLys peptidindeki tirozin ile ^3H -DFP'nin kovalent bir bağ oluşturduğunu göstermiştir (16). Daha sonra yapılan çalışmalarda soman, CPO, FP-biyotin, diklorvos ve DFP ile muamele edilen insan serum albüminin kütle spektrometri ile analizi sonucunda, modifiye olan LVRY₄₁₁TKKVPQVSTPTL peptidi tanımlanmıştır. Tanımlanan bu peptit dizisi ile Sanger'in daha önce tanımladığı amino asit dizisi doğrulanmış ve OP ile modifikasyonunun, albümindeki Tyr411 üzerinden olduğu kanıtlanmıştır (111, 124). OP yapılı bileşikler ile kovalent etkileşime giren diğer proteinleri tanımlamak için yapılan bir araştırmada ise, canlı fare ve fare dokuları FP-biyotin ile muamele edilmiştir. Kütle spektrometri sonuçları, OP ile etkileşime giren proteinlerin çoğunlukla albümin ve tübülün gibi yüksek ve bol miktarda bulunan proteinler olduğunu göstermiştir (84).

Ayrıca kütle spektrometri analizleri saf insan ve fare transferrin (125), insan kinesin (126), fare ATP sentetaz (126) ile de gerçekleştirilmiş ve OP'ler ile modifikasyonunun tirozin amino asidi üzerinden olduğu gösterilmiştir (Tablo 2.3.).

Son olarak, küçük sentetik peptitlerin DFP, CPO, diklorvos ve soman ile kovalent bir bağ oluşturduğu rapor edilmiştir (125). Soman ile ArgTyrGlyArgLys peptidinin etkileşimi, pinakolilfosfonat ile modifiye peptidi vermektedir ve kütle spektrum analizi, OP yapılı bileşiğin tirozine bağlandığını kesin olarak kanıtlamaktadır (127).

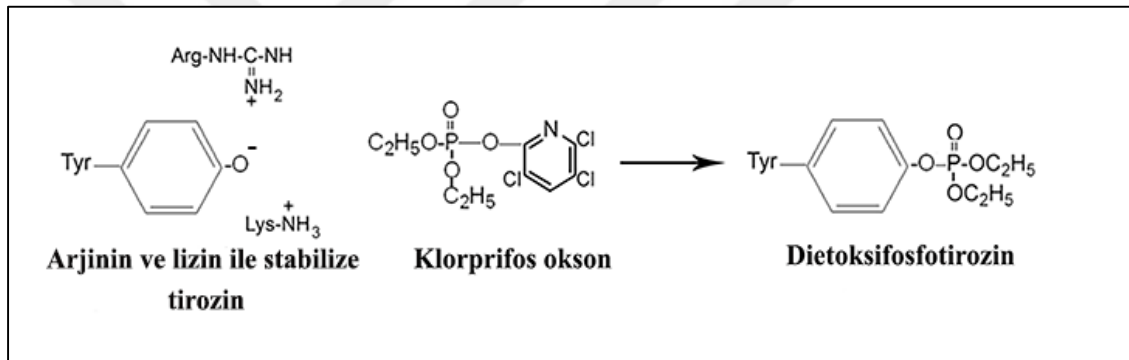
Tablo 2.3. OP yapılı bileşikler ile muamele edilen saf proteinlerin modifiye peptit dizileri.

Protein	Erişim ^a	OP ile modifiye tirozin	Referans
İnsan Albümini	gi 28592	NALLVRY ₄₁₁ TKKVPQ	(111, 128)
Sığır Albümini	gi 30794280	NALIVRY ₄₁₀ TRKVPQ	(129)
Kobay Albümini	gi 33518896	NALAVRY ₄₁₁ TQKAPQ	(130)
Sığır Tübülin A	gi 73586894	EVRTGTY ₈₃ RQLFHP	(121)
Sığır Tübülin B	gi 75773583	EATGGKY ₅₉ VPRAVL	(121)
Sığır Tübülin B	gi 75773583	SRGSQQY ₂₈₁ RALTVP	(121)
Sığır Tübülin B	gi 75773583	SKIREEY ₁₅₉ PDRIMN	(121)
Fare Tübülin B	gi 21746161	LERINVY ₅₀ Y ₅₁ NEATGN	(7)
İnsan Transferrin	gi 136191	RKPVDEY ₂₅₇ KDCHLA	(125)
İnsan Transferrin	gi 136191	RKPVVEEY ₅₉₃ ANCHLA	(125)
İnsan Kinesin 3C Motor Domain	gi 160286524	YLVRASY ₁₅₇ LEIYQE	(126)
Fare Transferrin	gi 21363012	RKPVdqY ₂₅₇ EDCY ₂₆₁ LARIPS	(125)
Fare Transferrin	gi 21363012	RMDYRLY ₃₃₃ LGHNY ₃₃₈ VTAIRN	(125)
Fare Transferrin	gi 21363012	GIFPKGY ₄₄₈ Y ₄₄₉ AVAVVK	(125)
Fare Transferrin	gi 21363012	QGCAPGY ₅₁₀ EKNSTL	(125)
Fare Transferrin	gi 21363012	PNNKEEY ₅₃₄ NGY ₅₃₇ TGAFRC	(125)
Fare ATP Sentaz	gi 20455479	QKILQDY ₄₃₁ KSLQDI	(126)
Papain	gi 129614	NEGALLY ₂₅₆ SIANQP	(131)

^aErişim numaraları NCBI veritabanından alınmıştır.

Klorprifosun tirozine bağlanma motifi

OP yapılı bileşikler, proteinler içerisindeki tüm tirozinlere bağlanmamaktadır. OP ile modifiye edilen peptitlerin dizileri birbirleri ile karşılaştırıldığında, serin hidrolazların aktif bölgesinde bulunan serin amino asidinde olduğu gibi, tirozin amino asidi etrafında herhangi bir konsensüs dizisi gözlenmemiştir. Ayrıca, reaktif tirozin için de bir konsensus dizi bulunmamaktadır fakat pozitif yüklü gruplar (His, Lys, Arg), genellikle reaktif tirozin etrafındaki beş amino asit birimi içerisinde bulunmaktadır. Pozitif yüklü amino asit birimlerinin, fenolik hidroksil ile etkileşime girerek pK_a 'yı düşürdüğü düşünülmektedir. Düşük pK_a değerine sahip olan tirozinler daha etkin bir nükleofil olarak davranmakta ve OP bileşiklere daha iyi saldırılmaktadır (Şekil 2.12.) (132).



Şekil 2.12. Tirozinat anyonunun klorprifos okson ile reaksiyonu. Negatif yüklü tirozin, pozitif yüklü arjinin ve lizin yan zincirleri ile etkileşime girerek stabilize edilmektedir (10).

Organofosfatların tirozine bağlanma karakteristiği

OP bağlanma motifinin yeni tanımlanması nedeniyle, tirozin-OP bağlanması hakkında çok az şey bilinmektedir. Somanın insan albüminindeki Tyr411'e bağlanma hız sabiti $15 \pm 3 \text{ M}^{-1}\text{dk}^{-1}$ olup, bağlanmanın oldukça yavaş olduğu gösterilmiştir (124, 133). Ancak OP yapılı bileşiklerin tirozine bağlanma hızının daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden OP ile modifiye daha fazla proteinin tanımlanması gerekmektedir.

İnsan albüminin Tyr411 üzerindeki OP eklentisi stabildir. Soman ile modifiye Tyr411 eklenti ürününün bozunması için yarı ömrün, pH 7.4 ve 22 °C'de 20 gün

olduğu gösterilmiştir (124). CPO ile modifiye Tyr411 eklenti ürünü ise daha stabildir. 22  C’de ve pH 7.4 tampon içerisinde, 7 ay sonra bile, Tyr411’in % 80’i, CPO’dan kaynaklanan dietoksifosfat eklenti ürünü ile modifiyedir. Ancak 22 C’de ve pH 8.3 tamponu içerisinde Tyr411 zerindeki dietoksifosfat eklenti ürünlerinin % 50’sini 3.6 ayda kaybetmektedir. –80  C’de saklanan OP-albümin modifikasyonu, pH 8.3, pH 7.4 ve pH 1.5’de stabildir (124).

CPO ile tirozin modifikasyonunun tanımlanmasının avantajı, hayvanda antikor üretimine izin verecek kadar uzun süre kararlı kalabilmesidir. Diğer bir avantajı ise, OP maruziyetinin, sonraki zamanlarda da örnekler üzerinde tanımlanmasına olanak sağlamasıdır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

İnsan serum albümini (HSA), sığır serum albümini (BSA), ovalbümin, lizozim, kazein, aprotinin, Sigma-Aldrich'den; fare albümini, Innovative Research'den ve domuz tübülün, Cytoskeleton'dan satın alındı. Peptitler, American Peptide Co., Sigma-Aldrich ve Genscript'ten temin edildi. Klorprifos okson (%98 saf) ve diklorvos, Chem Service'den; paraokson-etil, Sigma-Aldrich'den satın alındı. Protein G agaroz, Protein Mods; HRP ile konjuge at anti-fare IgG sekonder antikoru, Cell Signaling; anti-O-fosfotirozin monoklonal antikor klonu PY20, O-fosfo-L-tirozin ve tripsin, Sigma Aldrich ve bikinkoninik asit (BCA) protein assay kit, Thermo Scientific kaynaklıydı.

İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK 293) American Type Culture Collection (CRL-1573)'dan satın alındı.

Dietoksifosfotirozini tanıyan fare monoklonal antikor, depY bu çalışma kapsamında Syd Labs Inc tarafından üretildi.

3.1.2. Cihazlar

Kütle spektral verileri, üç farklı kütle spektrometre kullanılarak elde edildi: Triple TOF 6600 (ABI Sciex, Framingham, MA), OrbiTrap Füzyon Lumos (Thermo Scientific, Rockford, IL) ve 4800 MALDI-TOF-TOF (AB Sciex). 4800 MALDI-TOF-TOF kütle spektrometresi için örnekler, MALDI plaklara (Opti-TOF 384 Well Insert, Applied Biosystems) uygulandı.

Peptit-protein saflaştırma işlemlerinde, Waters HPLC (Milford, MA) sistemi, C18 Phenomenex kolonu, C18 Alltech 900 mg kartuş, SepPak C18 kartuş, Amicon Ultra-15 UFC901025 filtresi, 5K Dekstran kolonu, Microcon-YM10 santrifüj filtre (Ultracel 10 kDa), MCX kolon (OASIS MCX CC-30 mg, Waters), 0.45 mikronluk spin filtresi (Ultra serbest MC HVLP, Millipore) kullanıldı.

Peptitlerin, OP bileşikler ile inkübasyonu, Roto-Torque karıştırıcı (Cole Parmer Instruments) içerisinde gerçekleştirildi. Aktivite ve absorbans ölçümleri için Gilford spektrofotometresi (MacLab recorder, ADInstruments, Inc) kullanıldı. ELISA analizleri, 96-kuyulu plaklar (Immulon) ve 96-kuyulu plak okuyucusu (BioTek)

kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre lizatlarının hazırlanmasında Sonik Dismembratör Model 500 sonikatöründen (Fisher Scientific) yararlanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Dietoksifosfotirozin İçeren Peptitlerin Hazırlanması

Peptitler çok yüksek konsantrasyonda CPO veya paraokson ile yüksek pH tamponu içerisinde muamele edildiğinde; kendiliğinden tirozin üzerinde dietioksifosfat eklenti ürünleri oluşturmaktadır. Çalışmada, tirozin içeren ve 6 amino asitten uzun olmayan çeşitli peptitler seçilerek (Tablo 3.1.), dietioksifosforillenmiş-tirozin peptitler aşağıdaki yönteme göre hazırlandı: Örneğin 21 mM RSLYAS peptidi, 30 kat molar fazlası CPO (630 mM) ile 0.1 M sodyum karbonat pH 10 (5.5 ml) tamponu içerisinde, 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra MALDI-TOF kütle spektrometresi ile peptidin % 60'nın tirozinden dietioksifosfat ile modifiye olduğu gösterildi. Reaksiyona girmeyen CPO fazlası, TCP ve peptitlerden kloroform ekstraksiyonu ile uzaklaştırıldı. C18 Alltech 900 mg veya SepPak C18 kartuşları kullanılarak; TCP % 0.1 TFA ile; peptitler, %3-50 asetonitril ile elüe edildi.

Bir başka örnek ise, 10.5 mM YGGFL peptidi, 33 kat molar fazlası paraokson (346,5 mM) ile 1 M Tris pH 10.8 (12 ml) tamponu içerisinde 37°C'de 3 gün boyunca inkübe edildi. Reaksiyona girmeyen paraokson fazlası, p-nitrofenol ve peptitlerden kloroform ekstraksiyonu ile uzaklaştırıldıktan sonra paraokson ve peptitler, benzer şekilde elüe edildi.

Tablo 3.1. Dietoksifosfotirozin içeren peptitlerin hazırlanmasında kullanılan peptitler.

Peptitler	OP pestisit
RARYEM	Klorprifos okson
GGYR	Klorprifos okson/Paraokson
KYK	Klorprifos okson
RSLYAS	Klorprifos okson
PYYMRR	Klorprifos okson
PPYRM	Klorprifos okson
QYDVRK	Klorprifos okson
LYGLPR	Paraokson
PPYRM	Klorprifos okson
YGGFL	Klorprifos okson/Paraokson
HYRGPA	Klorprifos okson
EPNVSY	Paraokson
YPF	Klorprifos okson
KYA	Klorprifos okson

3.2.2. Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitlerin Saflaştırılması

Dietoksifosfotirozin-modifiye peptitler, modifiye olmayan peptitlerden HPLC ile C18 Phenomenex kolonu kullanılarak, % 0.1 trifloroasetik asit (TFA)- % 60 asetonitril (v/v) gradiyent tampon çözeltisi ile 1 saat boyunca ayrıldı. Toplanan fraksiyonlar MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analiz edilerek, modifikasyonun tirozin amino asidi üzerinden olduğu doğrulandı.

3.2.3. Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitler için Amino Asit Miktar Tayini ve Spektrumlarının Analizi

Dietoksifosforillenmiş tirozin içeren ve modifiye olmayan peptitlerin konsantrasyonları, Nebraska Üniversitesi Tıp Fakültesi (UNMC) Amino asit Analiz Birimi tarafından belirlendi. OP ile muamele öncesi ve sonrasında peptit çözeltileri, hidroliz edildi. Daha sonra Ninhidrin reaksiyonu ile amino asit miktarları belirlendi. Aynı peptit çözeltilerinin absorbans spektrumları, Gilford spektrofotometre ile elde edildi.

3.2.4. Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitlerin Taşıyıcı Proteinlere Konjugasyonu

Hazırlanan dietoksifosfotirozin modifiye peptitler (5 mg/ml), 0.1 M 2- [N-morfolino] etansülfonik asit (MES) pH 6.2 tamponu içerisinde bulunan taşıyıcı proteinlere [sığır serum albümini (BSA), insan serum albümini (HSA), ovalbümin ve lizozim, 2.6 mg/ml] N-hidroksisülfosüksinimid (Sülfo NHS, 2.5 mg/ml) ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC, 5.8 mg/ml) varlığında konjuge edildi (134). pH, 6.2'ye ayarlanarak reaksiyon karışımı, 2-3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra, reaktiflerin fazlası, Dekstran desalting kolonu (MA 5kDa'dan kesen) kullanılarak uzaklaştırıldı. Modifiye peptit-protein konjugatları, monoklonal antikor üretimi ve karakterizasyonunda (Tablo 3.2.) kullanıldı.

Tablo 3.2. Taşıyıcı proteinlere bağlı dietoksifosfotirozin modifiye peptitler.

Taşıyıcı Protein	Dietoksifosfo tirozin modifiye peptit	Miktar	Kullanım amacı
BSA	LYGLPR	2.5 mg/ml	Fare immünizasyonu
BSA	KYA	2.5 mg/ml	Fare immünizasyonu
BSA	PVYSR	2.5 mg/ml	Fare immünizasyonu
BSA	HYRGPA	2.5 mg/ml	Fare immünizasyonu
BSA	EPNVSY	2.5 mg/ml	Fare immünizasyonu
Ovalbümin	RSLYAS	2.5 mg/ml	<i>Boosting</i>
Ovalbümin	YGGFL	2.5 mg/ml	<i>Boosting</i>
Ovalbümin	YPF	2.5 mg/ml	<i>Boosting</i>
HSA	PPYRM	2.5 mg/ml	<i>Boosting- K_d analizi</i>
HSA	QYDVRK	2.5 mg/ml	<i>Boosting</i>
Lizozim	RARYEM	2.5 mg/ml	Görüntüleme
Lizozim	GGYR	1.25 mg/ml	Görüntüleme
Lizozim	KYK	1.25 mg/ml	Görüntüleme
HSA	YGGFL	2.5 mg/ml	ELISA-Western Blot
HSA	QYDVRK	2.5 mg/ml	ELISA-Western Blot
Lizozim	PYYMRR	2.5 mg/ml	ELISA-Western Blot
BSA	LYGLPR	2.5 mg/ml	ELISA-Western Blot-K _d analizi
Ovalbümin	RSLYAS	2.5 mg/ml	ELISA-Western Blot

3.2.5. MALDI-TOF Kütle Spektrometri ile Taşıyıcı Proteinlere Bağlı Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptit Sayılarının Belirlenmesi

Taşıyıcı proteinlere çapraz bağlanan dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin sayısı, MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılarak gözlenen taşıyıcı proteinlerin kütledeki değişim ile belirlendi (134). Örnekler (1 µl), MALDI hedef plağına uygulandı ve havaya karşı kurumasına izin verildi. Daha sonra örneklerin üzeri, sinapnik asit matriksi ile kaplandı. Kütle spektrumları; pozitif iyon modunda, kütle aralığı 30.000-100.000 Da seçilerek, 4800 MALDI-TOF/TOF kütle spektrometresi ile elde edildi (kutu boyutu 20 ns, dedektör voltaj çarpanı 0.95, ve gecikmeli ekstraksiyon 1650 ns). Düşük kütle girişi etkin ve 100 Da olacak şekilde, lazer voltajı 7800 volta ayarlandıktan sonra 3000 atış toplandı.

3.2.6. Proteinlerin Klorprifos Okson ile Muamele Edilmesi

ELISA ve Western blot analizlerinde kullanılmak üzere dietoksifosfotirozin modifiye proteinler hazırlandı (Tablo 3.3.). Bu amaçla, HSA, fare albümini, sığır aprotinin, sığır kazein, sığır tübülini ve domuz tübülini (0.5 mg/ml), 20 mM TrisCl pH 8.9-%0.01 sodyum azid tamponu içerisinde ve oda sıcaklığında 1.5 mM CPO ile 7 gün boyunca inkübe edildi. Bu işlemin ardından, disülfid bağları, ditiyotritol ile indirgendikten sonra iyodoasetamid ile alkilasyon işlemi gerçekleştirildi. Tripsinizasyon işlemi öncesinde, reaksiyon karışımı, 10 mM amonyum bikarbonat pH 8.9- % 0.01 sodyum azid tamponuna karşı diyalizlendi. Ardından proteinler, tripsin (20 µg/ml) ile muamele edilerek peptitlere parçalandı. Triptik peptitler, Triple TOF 6600 LC-MS/MS ile analiz edilerek, dietoksifosfotirozin modifiye amino asitler belirlendi. Veriler, Protein Pilot yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 3.3. CPO ile modifiye olan proteinler.

Protein	Erişim no
HSA	P02768
Fare albümin	P07724
Sığır Aprotinin; pankreatik tripsin inhibitör	P00974
Sığır Kazein izozim karışımı	
Alfa S1	P02662
Alfa S2	P02663
Beta	P02666
Kappa	P02668
Sığır tübülin	
Alfa-1B	P81947
Beta-4B	Q3MHM5
Domuz tübülin	
Alfa -1A	P02550
Alfa -1B	Q2XVP4
Beta	Q767L7

3.2.7. Monoklonal Antikor Üretimi

Antikorlar, Syd Labs (Natick, MA-USA) tarafından standart hibridoma füzyon teknolojisi kullanılarak üretildi. Fareler ilk aşamada BSA ile konjuge dietoksifosforile (DEP) tirozin içeren peptitler (PVYSR-DEP, LYGLPR-DEP, KYA-DEP, HYRGPA-DEP ve EPNVSY-DEP) ile immünize edildi. İkinci aşamada, güçlü bir yanıt elde etmek için fareler, ovalbümine konjuge dietoksifosforillenmiş tirozin içeren peptitler (RSLYAS-DEP, YGGFL-DEP ve YPF-DEP) ve HSA'ya konjuge dietoksifosforillenmiş tirozin içeren peptitler (PPYRM-DEP ve QYDVRK-DEP) ile muamele edildi. Daha sonra monoklonal antikor üreten hibridoma hücreleri elde edildikten sonra hibridoma hücreleri, % 10 fetal sığır serumu (FBS) içeren DMEM ortamı içerisinde büyütüldü. Hibridoma ortamları, lizozime konjuge tirozinden modifiye-peptitler (RARYEM-DEP, GGYR-DEP ve KYK-DEP) ve sonrasında CPO ile muamele edilen HSA ve fare albümini kullanılarak ELISA yöntemi ile test edildi.

ELISA sonuçları, 30 hibridoma kültür ortamından, sadece 4 klonun (3B9, 4H7, 7A8, 8B2) CPO ile muamele edilen HSA ve fare albümini için anlamlı sonuçlar verdiğini gösterdi. Bu sonuçlara göre; 4 hibridoma klonu saflaştırıldı ve dietoksifosforillenmiş tirozin içeren farklı proteinler kullanılarak, ELISA ile test

edildi. Elde edilen ELISA sonuçlarına göre; klon 3B9 seçilerek karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.8. Monoklonal Antikorun Saflaştırılması

Protein G agaroz içeren C16/20 kolonu (10 ml, Pharmacia), öncelikle nötralizasyonu sağlamak için 1M dibazik potasyum fosfat, pH 9 tamponu ile yıkandı. Filtre edilen ve monoklonal antikor içeren hibridoma kültür ortamı (580 ml) kolona uygulandı. Monoklonal antikor, 0.1 M sitrat, pH 2 tamponu ile kolondan elüe edildi ve 1M dibazik potasyum fosfat, pH 9 ile nötralize edildi. Toplanan her fraksiyonda protein içeriği (A_{280}), Gilford spektrofotometresi ile belirlendi. 0.055 M sitrat ve 0.44 M potasyum fosfat pH 6.7 tamponunda bulunan monoklonal 3B9 antikor (19 mg), Amicon Ultra-15 UFC901025 santrifüj filtresi kullanılarak fosfat ile tamponlanmış salin (PBS) içerisine alındı ve konsantre edildi.

Saflaştırılmış monoklonal antikor (3B9 klonu) depY olarak adlandırıldı; dep, dietoksifosfat için kısaltmayı ve Y ise tirozini ifade etmektedir.

3.2.9. Saflaştırılmış DepY'nin İzotipinin Belirlenmesi

Protein G agaroz ile saflaştırılan monoklonal antikor depY (10 μ g), tripsin (20 μ g/ml) ile parçalandıktan sonra Triple-TOF 6600 LC-MS/MS ile analiz edildi. Protein Pilot yazılımı kullanılarak, UniProt veritabanında saf depY'nin izotipi belirlendi.

3.2.10. DepY İmmobilize Sefaroz Reçinenin Hazırlanması

Siyanojen bromür (CNBr) ile aktive edilmiş sefaroza (1 g), önce 0.15 M sodyum bikarbonat-0.5 M NaCl pH 8 bağlama tamponu ile yıkandı, sonrasında PBS içerisinde bulunan 4.7 mg/ml depY monoklonal antikor (1ml) ve 0.15 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8 bağlama tamponu (0.5 ml) ile gece boyunca inkübe edildi. Daha sonra Sefaroz, 0.2 M trietonamin -% 0.025 sodyum azid pH 7.8 çözeltisi ile yıkanarak aktif olmayan bölgeler blokladı. Bloklama sonrasında reçine sırasıyla; 0.1M Tris- 0.5 M NaCl, pH 8 tamponu, 1 M NaCl, pH 3.5 ve PBS, pH 7.4 tamponları ile yıkandı. Sefaroz reçineye bağlanan depY antikorun miktarı, çapraz bağlanma öncesi ve sonrasında kolona bağlanmayan süpernatantların A_{280} 'lerinin ölçülmesiyle hesaplandı. Sonuçlar, 0.1 ml süspansiyonun, 20 μ l sefaroza reçineden oluştuğunu ve Sefaroz 30 μ g depY antikorunun bağlandığını gösterdi.

3.2.11. ELISA

96-kuyulu plaklar, kaplama tamponu (3 g Na₂CO₃ - 6 g NaHCO₃/1 l distile su, pH 9.6, 100 µl) içerisindeki 1 µg antijen ile gece boyunca inkübe edildi. Kuyular, % 1 (a/h) BSA içeren Tris ile tamponlanmış salin (TBS, 20 mM TrisCl, 0.15 M NaCl pH 7.4) ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı, % 0.05 (h/h) Tween 20 içeren TBS (TBST) ile 1 kez yıkandı. Daha sonra kuyular, % 1 BSA/TBS içerisinde 0.2 µg/ml'ye seyreltilen depY ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi, 3 kez TBST ile yıkanarak antikoru fazlası uzaklaştırıldı. Ardından kuyular, horseradish peroksidaz (HRP) ile konjuge anti-fare IgG sekonder antikor (1:4000) ile 2 saat inkübe edildi, 5 kez TBST ile yıkandı. Yıkama aşamasından sonra her kuyuya 100 µl 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) veya o-fenilendiamin (OPD) eklendi ve HRP reaksiyonu, 20 dakika sonra her kuyuya 100 µl 0.16 M sülfirik asit (100 µl) eklenerek durduruldu. TMB için 405 nm'de, OPD için 490 nm'deki absorban değerleri, mikropilaka okuyucusu ile ölçüldü.

3.2.12. Western Blot Analizi

Dietoksifosfotirozin modifiye proteinler (1 µg), Laemmli tamponu (0.125 M Tris/HCl, %20 gliserol, %4 SDS, %0.0025 bromfenol mavisi ve %10 β-merkaptotanol pH 6.8) ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 95 °C'de beş dakika kaynatıldı. Ardından, örnekler % 4-20 gradient jelle yüklenerek sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) işlemine tabi tutuldu (120 Volt, ~1 saat). Daha sonra jeldeki proteinler, Biorad mini trans-blot elektroforetik transfer hücresi kullanılarak, 0.45 µm polivinilidenflorit (PVDF) membrana transfer edildi (350 mA, 1 saat). Transfer işleminden sonra membran, 10 dakika 3 kez TBST tamponu ile yıkandı. Membran daha sonra, bloklama tamponu ile (% 5 yağsız süt tozu içeren TBS, pH 7.6) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi; non-spesifik bölgeler bloklandı. Bloklama sonrasında membran, bloklama tamponu içerisindeki depY monoklonal antikor (0.14 µg/ml) ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Membrana bağlanmayan primer antikoru fazlası, membranın 3 kez 10 dk süreyle TBST tamponu ile yıkanması ile uzaklaştırıldı. Daha sonra membran, 1:10.000 oranında seyreltilmiş, bloklama tamponu içerisindeki HRP ile konjuge anti-fare IgG sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bağlanmayan sekonder antikoru fazlası, membranın 3 kez

10 dk süreyle TBST tamponu ile yıkanması ile uzaklaştırıldı. Son aşamada membran, Pierce ECL ile 1 dakika inkübe edildikten sonra plastik bir membran koruyucu içerisinde X-Ray filmi üzerinde görüntülendi.

3.2.13. İnsan Serum Albümine Konjuge Dietoksifosfolizinin

Hazırlanması ve DepY Monoklonal Antikor ile ELISA

25 mM amonyum bikarbonat, pH 8 tamponunda bulunan 2 mM L-lizin, 20 mM CPO ile 9 gün boyunca 37°C'de inkübe edildi. MALDI-TOF kütle spektrometri sonuçları, L-lizin amino asidinin (147 Da) %50'sinin dietoksifosfat eklentisi (+136 Da) ile kütlesi 283 Da olan dietoksifosfolizin oluşturduğunu gösterdi. CPO'nun fazlası ve reaksiyona girmeyen lizin, C18 kartuşundan geçirilerek uzaklaştırıldı.

0.1 M MES pH 6.2 tamponu içerisindeki HSA (2.4 mg/ml) ve hazırlanan dietoksifosfolizin peptidi (0.56 mg/ml), 2.5 mg/ml sülfö N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 5.8 mg/ml 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karboimid (EDC) varlığında konjuge edildi. pH 6.2'ye ayarlanarak reaksiyon karışımı (0.8 ml), 3 saat boyunca karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında inkübe edildi. Reaktiflerin fazlası, taşıyıcı proteinine konjuge dietoksifosfolizinden, Dekstran desalting kolonu kullanılarak uzaklaştırıldı.

MALDI-TOF kütle spektrometri analizleri, her HSA molekülüne 14 adet dietoksifosfolizin peptidinin bağlandığını gösterdi (Bkz 3.2.5.).

96-kuyulu plaklar, HSA ile konjuge dietoksifosfolizin (1 µg/kuyu) ile kaplandı. Pozitif kontrol olarak, CPO ile modifiye domuz tübülün ve negatif kontrol olarak, CPO ile muamele edilmemiş HSA kullanıldı. Daha sonra depY monoklonal antikorun (2 µg/ml), dietoksifosfolizini bağlaması ELISA ile test edildi (Bkz. 3.2.11.).

3.2.14. Klorprifos Okson, Diklorvos ve Krezil Saligenin Fosfat ile

Modifiye İnsan BChE'nin Hazırlanması ve DepY Monoklonal Antikor ile ELISA

ELISA kaplama tamponu ile seyreltilen saf insan BChE örneği (5 U/ml), aktivitesinin %99'u inhibe olacak şekilde, farklı OP bileşikler (CPO, diklorvos ve CBDP) ile muamele edildi. BChE aktivitesi, spektrofotometrik olarak 25°C'de Ellman yöntemine göre tayin edildi (135). Aktivite ölçümleri, 1 mM bütiriltiyokolin ve renklendirme reaktifi olarak 0.5 mM 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) içeren 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.0 içerisinde yapıldı. Bütiriltiyokolinin hidrolizi, 412

nm'deki absorbans artışı üzerinden izlendi. BChE aktivitesi, absorbans-zaman eğrisinin ilk 60 saniyelik zaman içerisindeki lineer kısım kullanılarak hesaplandı. Bir ünite enzim, bir dakikada hidroliz edilen 1 μ mol bütiriltiyokolin olarak tanımlandı.

Daha sonra inhibe edilen BChE örnekleri bir dakika boyunca su banyosunda kaynatıldı.

96-kuyulu plaklar, CPO ile modifiye BChE, diklorvos ile modifiye BChE ve CBDP ile modifiye BChE (1 μ g/kuyu) örnekleri ile kaplandı. DepY monoklonal antikorun (2 μ g/ml), örnekleri bağlaması ELISA ile test edildi (Bkz. 3.2.11).

3.2.15. Diklorvos ile Modifiye Peptitlerin Hazırlanması ve DepY

Monoklonal Antikor ile İmmuno MALDI

Diklorvos, CPO'nun aksine proteinlerin tirozin amino asidi üzerinde dimetoksifosfat eklenti ürünü oluşturmaktadır ve bu ürün yaşlanma reaksiyonu sonrasında monometoksifosfat eklenti ürününe dönüşmektedir. CPF ve CPO ile muamele sonrasında, tirozin üzerindeki dietoksifosfat eklenti ürünlerini tanıyan depY monoklonal antikorun, tirozindeki dimetoksifosfat ve monometoksifosfat eklenti ürünlerini tanıyıp tanımadığını test etmek için diklorvos ile modifiye peptit hazırlandı.

1 M Tris, pH 10 tamponu içerisinde bulunan 2.7 mM GGYR peptidi, 81 mM diklorvos ile 37°C'de 12 gün boyunca inkübe edildi. Diklorvos ile modifiye peptit, daha sonra C18 Phenomenex kolonu kullanılarak HPLC ile kısmen saflaştırıldı. Her aşamada toplanan fraksiyonların, MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analiz edilmesi sonucunda; dimetoksifosfat ve yaşlanma ürünü olan monometoksifosfat eklenti ürünlerinin, tirozin amino asidi üzerinde olduğu doğrulandı. Daha sonra Sefaroz reçineye kenetli depY antikorunun bu eklenti ürünlerini bağlayıp bağlamadığı aşağıdaki yöntem kullanılarak test edildi:

DepY antikoru içeren sefroz reçine (20 μ l), diklorvos ile modifiye GGYR peptit ve CPO ile modifiye YGGFL peptitlerini içeren karışım (0.01 ml) ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. DepY antikoru içermeyen sefroz reçine ise, peptitlerin reçineye nonspesifik olarak bağlanıp bağlanmadığını test etmek için negatif kontrol olarak kullanıldı ve aynı peptitleri içeren karışım (0.01 ml) ile 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında reçineler, PBS ile 2 kez yıkandı, sonrasında reçineden %50 asetonitril-%1 trifloroasetik asit (TFA) çözeltisi geçirilerek bağlı peptitler elüe

edildi. Daha sonra örnekler, MALDI hedef plağına uygulandı ve örneklerin üzeri α -siyano-4-hidroksisinnamik asit matriksi (α -CHCA) ile kaplanarak MALDI-TOF kütle spektrometri yöntemi ile analiz edildi. Pozitif yüklü iyonlar için monoizotopik kütleler, 560.2 Da (dimetoksifosfotirozin eklenti ürüne sahip GGYR), 546.2 Da (monometoksifosfotirozin eklenti ürüne sahip GGYR) ve 692.2 Da (dietoksifosfotirozin eklenti ürününe sahip YGGFL) olacak şekilde analiz gerçekleştirildi.

3.2.16. IC₅₀ Değerinin Yarışmalı ELISA ile Belirlenmesi

CPO ile tirozin amino asidi üzerinden modifiye edilen domuz tübülünün, monoklonal antikor depY'e olan afinitesi, yarışmalı ELISA ile belirlendi. 96-kuyulu plağın her bir kuyusu 1 μ g CPO ile modifiye edilmiş HSA-QYDVRK-DEP ile kaplandı. DepY (0.1 μ g/ml), farklı konsantrasyonlardaki CPO ile modifiye edilen domuz tübülünü (10^{-17} - 10^{-7} M) ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra kuyulara eklendi ve monoklonal antikorun, plaklardaki antijeni bağlama afinitesi, HRP-konjuge sekonder antikor kullanılarak sinyal yoğunluğu ile değerlendirildi.

3.2.17. K_d Değerinin Bio-Layer İnterferometri ile Belirlenmesi

Analizler, Dr. Udaya Yerramalla tarafından, bio-layer interferometri yöntemi kullanılarak OctetRED96 cihazında gerçekleştirildi:

20 μ g depY monoklonal antikor, anti-fare IgG Fc ile kaplanmış olan bir biyosensöre bağlandı ve örneklerin (domuz tübülünü-DEP, kontrol domuz tübülünü, kazein-DEP, kontrol kazein, ovalbümin-YPF-DEP, ovalbümin-YPF, BSA-LYGLPR-DEP ve BSA-LYGLPR) depY antikoruna bağlanma afinitesi test edildi. Örnekler, PBS, % 0.01 BSA, % 0.002 Tween-20 içerisinde hazırlandı ve 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 nm örnek konsantrasyonları kullanılarak, birleşme ve ayrılma hız sabitleri, ölçüldü. Ayrılma hızını ölçmek için proplar, tampon içerisine daldırıldı. Biosensör yüzeyi, her bağlanma deneyinden sonra 10 mM glisin, pH 1.75 ile rejenere edildi. Veriler, ForteBio Veri Analiz Yazılımı, sürüm 8.0 kullanılarak analiz edildi.

3.2.18. K_d Değerinin Biacore Analizi ile Belirlenmesi

Peptit örneklerinin (YPF-DEP, kontrol YPF; GGYP-DEP, kontrol GGYP; LYGLPR-DEP, kontrol LYGLPR; PPYRM-DEP ve kontrol PPYRM) depY antikoruyla bağlanma afinitesi, Dr. Udaya Yerramalla tarafından 25 °C’de Biacore T-200 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi:

DepY antikoru, çapraz bağlanma ajanları EDC/NHS varlığında bir CM5 çip üzerine immobilize edildi. Daha sonra 1 M etanolamin ile bloklama yapıldıktan sonra, 10 mM HEPES tamponu pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, % 0.05 polioksietilensorbitan içerisinde bulunan dietoksifosfotirozin modifiye peptitler, 30 µL/dk akış hızı ile sisteme enjekte edildi. Dietoksifosforillenmiş tirozin içeren peptitlerin konsantrasyonları, 0-1000 nM idi. Her deneyden sonra çip, 10 mM glisin, pH 1.75 ile rejenere edildi. Bağlanma denge sabiti K_d ’yi hesaplamak için BIAevaluation T-200 yazılımı, sürüm 2.0 kullanıldı. Herbir reaksiyon döngüsünde elde edilen yüzey plazmon rezonans sinyali, sensör gram olarak kaydedildi. Analizlerin doğruluğunu belirlemek için gerçek sensör gram ve BIAanalysis yazılımından üretilen sensör gram arasında ki kare analizi yapıldı.

3.2.19. DepY Monoklonal Antikor ile Tanımlanabilen En Düşük Antijen Miktarının Western Blot Analizi ile Belirlenmesi

DepY antikoru ile tanımlanabilen en düşük antijen miktarını değerlendirmek için Western Blot yöntemi kullanıldı. HSA-YGGFL-DEP örnekleri (5-100 µg) jelle uygulanarak SDS jel elektroforezine tabi tutuldu. Daha sonra jeldeki örnekler, PVDF membrana transfer edildi. PVDF membran, depY monoklonal antikor (0.14 µg/ml) ile 4°C’de gece boyunca inkübe edildi ve sonrasında HRP konjuge sekonder antikor ile muamele edilerek görüntülendi (Bkz. 3.2.12.).

3.2.20. İnsan Serum Albümine Konjuge O-fosfo-L-tirozinin

Hazırlanması ve PY20 Monoklonal Antikor ile Western Blot Analizi

Ticari anti O-fosfo-L-tirozin, PY20 monoklonal antikorun, dietoksifosforile-tirozin modifiye proteinleri tanıyıp tanımadığını test etmek için, 0.1 M MES, 0.9 M NaCl, % 0.02 azid, pH 4.7 tamponu içerisinde bulunan O-fosfo-L-tirozin (4 mg/ml),

HSA'ya (10 mg/mL, 0.2 ml), EDC (10 mg/ml, 50 µl) varlığında konjuge edildi. Reaksiyon karışımı (0.8 ml) karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Daha sonra, reaktiflerin fazlası, Dekstran desalting kolonu (MA 5kDa'dan kesen) kullanılarak uzaklaştırıldı.

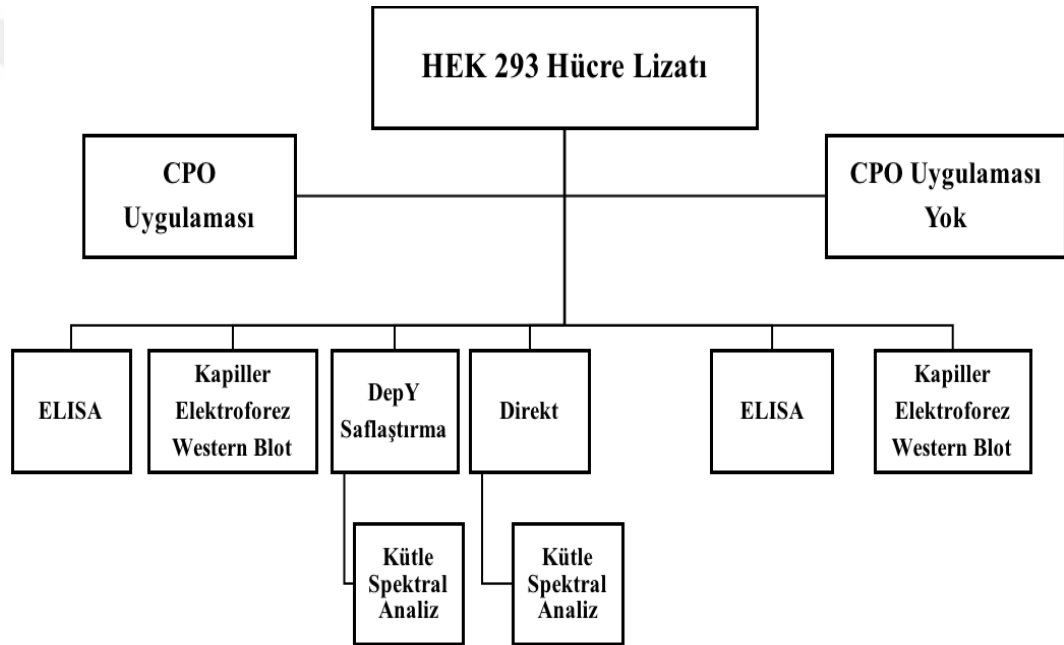
MALDI-TOF kütle spektrometri analizi ile her albümin molekülüne 4 adet fosfo-tirozin (243 Da) bağlandığı gözlemlendi. O-fosfo-L-tirozin ile konjuge HSA, pozitif kontrol olarak; lizozim-PYMRR-DEP, HSA-YGGFL-DEP, HSA-QYDVRK-DEP, BSA-LYGLPR-DEP, domuz tübülün-DEP, HSA ve domuz tübülünü negatif kontrol olarak kullanıldı. Proteinler (1 µg), SDS jel elektroforezi sonrasında, PVDF membrana transfer edildi. PVDF membran 0.5 µg/ml anti O-fosfo-L-tirozin monoklonal antikor PY20 ve sonrasında HRP-konjuge sekonder antikor ile inkübe edilerek görüntülendi (Bkz. 3.2.12.).

3.2.21. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Klorprifos Okson ile Muamele edilmesi

İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK 293), 75 cm²'lik flakonlar içerisinde % 10 FBS içeren Dulbecco's Modified Eagle ortamında (DMEM), 37°C ve %5 CO₂ varlığında %80-90 yaygınlık gösterene kadar çoğaltıldı. Daha sonra hücreler, PBS ile yıkandı ve 3 adet 75 cm²'lik flakondan elde edilen hücre pelletleri, 2.1 ml RIPA tamponu (25 mM TrisCl pH 7.6, 150 mM sodyum klorür, % 1 sodyum deoksikolat, % 0.1 sodyum dodesilsülfat) içerisinde süspande edildi, 4°C'de Sonik Dismembrator Model 500 ile 10 sn sonike edildi ve sonikasyonun ardından karışım, 10 sn buz üzerinde inkübe edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Daha sonra karışım, 14.000xg'de 20 dakika santrifüjlenerek çözümlü fraksiyonlar elde edildi.

Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları, BCA protein assay kiti kullanılarak belirlendi (136). Daha sonra hücre lizatları (4.9 mg/ml protein), herbiri 0.4 ml olacak şekilde, 5 porsiyona bölündü: İlk porsiyon, CPO ile muamele edilmeyen kontrol grubu için ayrıldı ve kontrol grubu için hücre lizatına 1.4 µl etanol eklendi. Diğer dört porsiyon ise, son konsantrasyonları 10, 100, 250 veya 1000 µM olacak şekilde stok CPO çözeltileri ile oda sıcaklığında 24 saat inkübe edildi. Stok CPO çözeltileri (3-300 mM) taze olarak etanol içerisinde hazırlandı. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda CPO ile muamele edilmiş hücre lizatlarının bir kısmı ELISA ve

kapiller elektroforez-Western Blot analizleri için kullanıldı. Ayrıca kalan her bir CPO ile muamele edilmiş hücre lizatları, tripsinize edilerek kütle spektrometre analizleri için iki porsiyona daha ayrıldı. İlk porsiyondaki triptik peptitler, LC-MS/MS için depY antikoruna ile immünopürifiye edilirken, diğer porsiyondaki triptik peptitler, immünopürifikasyon yapılmadan doğrudan LC-MS/MS analizi için kullanıldı. Şekil 3.1., CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatının (4.9 mg/ml) LC-MS/MS, ELISA ve kapiller elektroforez-Western Blot analizleri için kullanım şeklini göstermektedir.



Şekil 3.1. CPO ile muamele edilmiş hücre lizatları ile çalışma planı. 4.9 mg/ml protein konsantrasyonuna sahip hücre lizatı, CPO ile muamele edildi. CPO ile muamele edilen hücre lizatının bir kısmı, tripsinize edildi. Triptik peptitler, doğrudan ve depY monoklonal antikor immobilize sefaroza reçine ile immünopürifiye edildikten sonra LC-MS/MS ile analiz edildi. Ayrıca CPO ile muamele edilmiş ve kontrol hücre lizatları, depY monoklonal antikor kullanılarak ELISA ve kapiller elektroforez- Western Blot yöntemleri ile analiz edildi (137).

3.2.22. Hücre Lizatlarının ELISA ile Analizi

96-kuyulu plaklar, kaplama tamponu içerisinde, kontrol ve CPO ile muamele edilmiş hücre lizatları (1 µg hücre lizatı/kuyu) ile kaplandı. DepY antikorun (0.2 µg/ml), örnekleri bağlaması ELISA ile test edildi (Bkz. 3.2.11).

3.2.23. Hücre Lizatlarının Kapiller Elektrophorez- Western Blot ile Analizi

HEK 293 hücre lizatları için kapiller elektrophorez-Western blot analizi, Ray Biotech Inc (Norcross, GA, ABD) tarafından, WES kapiller elektrophorez cihazı (ProteinSimple, San Jose, CA, ABD) kullanılarak aşağıdaki yönteme göre gerçekleştirildi:

Kontrol ve 10-1000 µM CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatları (4.9 mg/ml protein) 0.2 mg/ml'ye seyreltildikten sonra kapiller elektrophorez cihazına (40 nl) enjekte edildi. Elektrophorezden sonra, proteinler, foto-aktivasyon ile kapiller duvara immobilize edildi. Daha sonra matriks kaldırıldı ve depY monoklonal antikor (0.02 mg/ml) kapillerden geçirildi. DepY antikoruna bağlanan proteinler, HRP ile konjuge anti-fare IgG sekonder antikor kullanılarak kemilüminesan substrat ile belirlendi.

3.2.24. Kütle Spektrometri Analizleri için Hücre Lizat Örneklerinin Hazırlanması

Kütle spektrometri için örnekler, Wisniewski ve ark. tarafından önerilen yönteme göre hazırlandı (138):

Kontrol ve CPO ile muamele edilmiş hücre lizat örneklerindeki (380 µg protein) disülfid bağları, 0.1 M TrisCl pH 8.5 tamponu-8 M üre içindeki 10 mM ditiyotreitölün (DTT) eklenmesiyle indirgenmiştir. Örnekler vorteksenerek 3 dakika kaynar su banyosunda ısıtıldı. Daha sonra her bir örnek, 0.1 M TrisCl pH 8.5 içerisindeki 8 M üre ile karıştırılıp, Microcon-YM10 santrifüj filtre içerisine yerleştirildi ve örneğin tamamı filtreden geçene kadar 14.000xg'de 10 dk santrifüj edildi. DTT fazlasını uzaklaştırmak için filtre, 8 M üre ile yıkandı ve 14.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlem, iki kez tekrarlandı. Daha sonra sülfidril gruplarını karbamidometile dönüştürmek için filtre üzerindeki proteine, 0.1 M TrisCl pH 8.5-8 M üre, içerisinde hazırlanan 55 mM iyodoasetamid ilave edildi, 1 dakika

vortekslendikten sonra 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. İyodoasetamidin fazlası 14.000xg'de 10 dakika santrifüjleme ve sonrasında filtre ünitesini, 8 M üre ile iki kez yıkama ile uzaklaştırıldı. Daha sonra herbir filtre ünitesinin içeriği 50 mM amonyum bikarbonat, pH 8 tamponu ile dengelendi, 14.000xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra her bir filtrenin içeriği 100 µL 50 mM amonyum bikarbonat pH 8 tamponunun içerisinde süspande edildi ve 0.4 mg/mL tripsin (10 µl; tripsin: protein ~ 1: 100 µg /µg) ile karıştırıldı

Tripsinizasyon, filtre üzerinde, nemlendirilmiş bir haznede 37°C'de gece boyunca (16-18 saat) gerçekleştirildi. Filtre üniteleri, 14.000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek triptik peptitler yeni bir tüp içerisinde toplandı, 0.5 M sodyum klorür (100 µl) ile yıkandı, tekrar 14.000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek aynı tüp içerisinde peptitler toplandı. Daha sonra peptitler SpeedVac vakum santrifüjü kullanılarak kurutuldu ve % 0.4 formik asit pH 3 içerisinde yeniden süspande edildi. Asitleştirilen peptitler, 1:1 oranındaki metanol: su çözeltisi ile önceden dengelenmiş olan MCX kolonu kullanılarak tuzdan arındırıldı.

Kolonlar, % 5 metanol, % 0.1 formik asit ile, ardından % 100 metanol ile yıkandı. Peptitler, MCX kolonundan elüsyon tamponu (1:19 oranında % 28 amonyum hidroksit : % 100 metanol, 1 ml) ile elüe edildi. Triptik peptitleri içeren 1 ml'lik elüatlar 2 ayrı tüpe eşit olarak bölünüp kurutuldu.

Bir tüpün içeriği (hiçbir kayıp olmadığı varsayıldığında; yaklaşık 10 µg/µl protein içermektedir), 20 µl % 0.1 formik asit içerisinde çözüldü ve Triple-TOF 6600 LC-MS/MS ile analiz edildi.

Diğer tüpün içeriği, Sefaroza bağlı depY antikoru kullanılarak dietoksifosfotirozin peptitleri açısından zenginleştirildi: Dietoksifosfotirozin işaretli hücre lizatlarından elde edilen triptik peptitler, PBS (200 µl) ile süspande edildikten sonra, PBS içerisinde 40 µl depY antikoru içeren sefaroze reçine ile 2 saat inkübe edildi. Daha sonra reçine, 0.45 mikronluk bir spin filtresi içerisine yerleştirildi ve 3 kez PBS ve ardından distile su ile 3 kez daha yıkandı. DepY-Sefaroz reçineye bağlı peptitler, % 50 asetonitril-% 1 trifloroasetik asit ile elüe edildi, SpeedVac içerisinde kurutuldu ve Triple-TOF 6600 LC-MS/MS analizi için % 0.1 formik asit (20 µl) içerisinde yeniden süspande edildi (immunosafılaştırılan örnekler, <10 µg/µl protein).

3.2.25. Triple-TOF 6600 Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometri

Peptit örnekleri ($\leq 50 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UHPLC) sistemine bağlı Triple-TOF 6600 kütle spektrometresine yüklendi. Bu sistemde, ayrı bir Ultra 1D Plus ultra-yüksek basınçlı kromatografi sistemi (Eksigent, Dublin, CA), cHiPLC Nanoflex mikroçip kolon sistemi (Eksigent, Dublin, CA) vasıtasıyla Triple-TOF'a bağlanmaktadır. Nanoflex sistemi, değiştirilebilir mikro akışkan trap kolonu ve değiştirilebilir ayırma kolonu kullanmaktadır. Her ikisi de ChromXP C18 (3 μm , 120 Å partiküller; Trap: 200 μm x 0.5 mm; Ayırım: 75 μm x 15 cm) ile paketlenmektedir.

Kromatografi solventleri olarak su/asetonitril/formik asit (A: % 100/0/0.1, B: % 0/100/ 0.1) kullanıldı. Yakalama (trapping) ve tuzdan arındırma işlemi, 2 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızı ile 15 dakikada % 100 mobil faz A uygulanarak gerçekleştirildi. 0.3 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızı ile kolona % 5 solvent A- % 95 solvent B'den başlayarak, % 70 solvent A ve % 30 solvent B olacak şekilde 60 dakika lineer gradiyentin uygulanması ile peptitler elüe edildi.

Elüat, 300 nl/dk akış hızı ile Nanospray III kaynağı ve a Pico Tip emitter içeren Triple-TOF 6600 kütle spektrometresi içerisine elektrospreylendi. Kütle spektrumları, pozitif iyon reflektör modunda, 200-2000 m/z 'lik bir kütle aralığında, 250 ms'lik birikim süresi, 10 V çarpışma enerjisi, 60 V azaltma potansiyeli, 2700 V iyon püskürtme potansiyeli, ve 150 °C'lik ara yüzey ısıtıcı sıcaklığı kullanılarak elde edildi. 2×10^{-5} Torr basınçta kollezyon gazı olarak azot kullanılarak çarpışma-indüklü ayrışma ile peptitler fragmanlarına ayrıldı. Fragmentasyon spektrumları pozitif modda, 50–2000 Da'lık bir kütle aralığında, 25 ms'lik bir birikim süresi, yazılım tarafından belirlenen $\pm 15\text{V}$ bir çarpışma enerjisi kullanılarak toplandı. Fragmanlar ayrılacak peptitler, 1-4 yüklenme durumu ve minimum 100 cps'lik sinyal algoritması kullanılarak seçildi. Herbir aşamada 50 kadar fragmentasyon spektrumu toplandı.

Triple TOF verileri, Protein Pilot yazılımı 4.0.8085 (AB Sciex, Framingham, MA) içindeki Paragon algoritması 5.5²⁴ kullanılarak değerlendirildi. Veritabanı arama parametreleri (Örnek tipi: tanımlama, Sistein alkilasyon: İyodoasetamid, Parçalanma: Tripsin, Cihaz: Triple TOF 6600, Özel faktörler: Organofosforilasyon, Tür: Homo sapiens, Kimlik odak: Biyolojik modifikasyonlar, Veritabanı: uniprot_sprotJAN2015.fasta, Arama: kapsamlı ve FDR analizi: aktif) seçildi.

Paragon algoritmasının özel faktörler bölümüne organofosforilasyon adlı yeni bir bölüm eklendi. Bu bölüm, tirozin, lizin, serin, treonin, histidin ve sistein üzerinde dietoksifosfat eklenti ürünü (+136.03 amu) ve aynı zamanda tirozin ve serin üzerinde monoetoksifosfat eklenti ürünü (+108.00 amu) taramalarını içerecek şekilde Parametre Translation. xml ve Protein Pilot Veri Dictionary.xml dosyaları modifiye edildi. Protein Pilot tarafından tanımlanan peptitlerin dizileri ve modifiye birimlerin yerleri PeakView sürüm 2.1 (Ab Sciex, Framingham, MA) kullanılarak manuel dizi analizi ile de doğrulandı.

3.2.26. OrbiTrap Fusion Lumos Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometri

1000 μ M CPO ile muamele edilen hücre lizatlarına ait peptitler, Ultimate 3000 UHPLC (Dionex, Sunnyvale, CA) kullanılarak doğrudan Orbitrap kütle spektrometresine yüklendi. Kromatografi sistemi, Acclaim PepMap RSLC C18 kolonu (75 μ m x 150 mm) ve bir Acclaim PepMap 100 tutucu kolon (75 μ m x 20 mm) içermektedir.

İmmunopürifiye edilen triptik peptitlerin 1 μ g'ı ve immunopürifiye edilmemiş triptik peptitlerin 2 μ g'ı tutucu kolon üzerine yüklendi. Kromatografi solventleri olarak su/asetonitril/formik asit (A: % 100/0/0.1, B:% 0/100/0.1) kullanıldı. Yakalama ve tuzdan arındırma işlemi, 4 μ l/dk akış hızı ile 15 dakika % 100 solvent A'nın uygulanması ile gerçekleştirildi. Daha sonra, kolona 0.3 μ l/ dk akış hızı ile 90 dakika % 3 solvent A ve % 97 solvent B'den başlayarak % 55 solvent A ve % 45 solvent B olacak şekilde lineer gradiyentin uygulanması ile peptitler elüe edildi.

OrbiTrap Fusion Lumos, bir Nanospray Flex NG iyon kaynağı ve paslanmaz çelik Nano-bore emitter içermektedir. Kütle spektrumları, pozitif modda, 120.000 çözünürlükte, 400-1600 m/z 'lik bir kütle aralığında toplandı.

Ana iyonlar OrbiTrap'ta ayrıldı. En iyi 10 peptit, fragmentasyon için seçildi. Fragmentasyon, hem çarpışma indüklü disosiyasyon (CID) hem de yüksek enerji çarpışma indüklü disosiyasyon (HCD) ile gerçekleştirildi. CID, iyon Trap içerisinde minimum 50.000 eşik değeri; 2 m/z izolasyon genişliği, 35 V normalize enerji; 0.25 aktivasyon Q, 2 varsayılan yüklenme durumu ve 10 msn aktivasyon süresi kullanılarak meydana getirildi. HCD, minimum 50.000 eşik değeri, 60.000 çözünürlük, 2 m/z

izolasyon genişliği, 44 V normalize enerji, 2 varsayılan yüklenme durumu ve 0.1 msn aktivasyon süresi kullanılarak OrbiTrap içerisinde gerçekleştirildi.

OrbiTrap sonuçlarına ilişkin veritabanı araştırması, Proteome Discoverer 2.1'deki Sequest HT algoritması kullanılarak yapıldı. Fragmentasyon spektrumları, veritabanı: Homo sapiens SwissProtv2017-06-07; proteaz: tripsin; peptit uzunluğu: 6-144; prekürsör kütle toleransı: 10 ppm; parça kütle toleransı: 0.6 Da; değişken modifikasyonlar: okside metiyonin, fosfoferin, fosfotreonin, fosfotirozin, dietoksifosfoferin, dietoksifosfotreonin, dietoksifosfotirozin, dietoksifosfolizin, dietoksifosfosistein, dietoksifosfohistidin, monoetoksifosfotreonin, monoetoksifosfotirozin, monoetoksifosfolizin ve monoetoksifosfosistein; sabit modifikasyon: karbamidometillenmiş sistein olacak şekilde belirlendi.

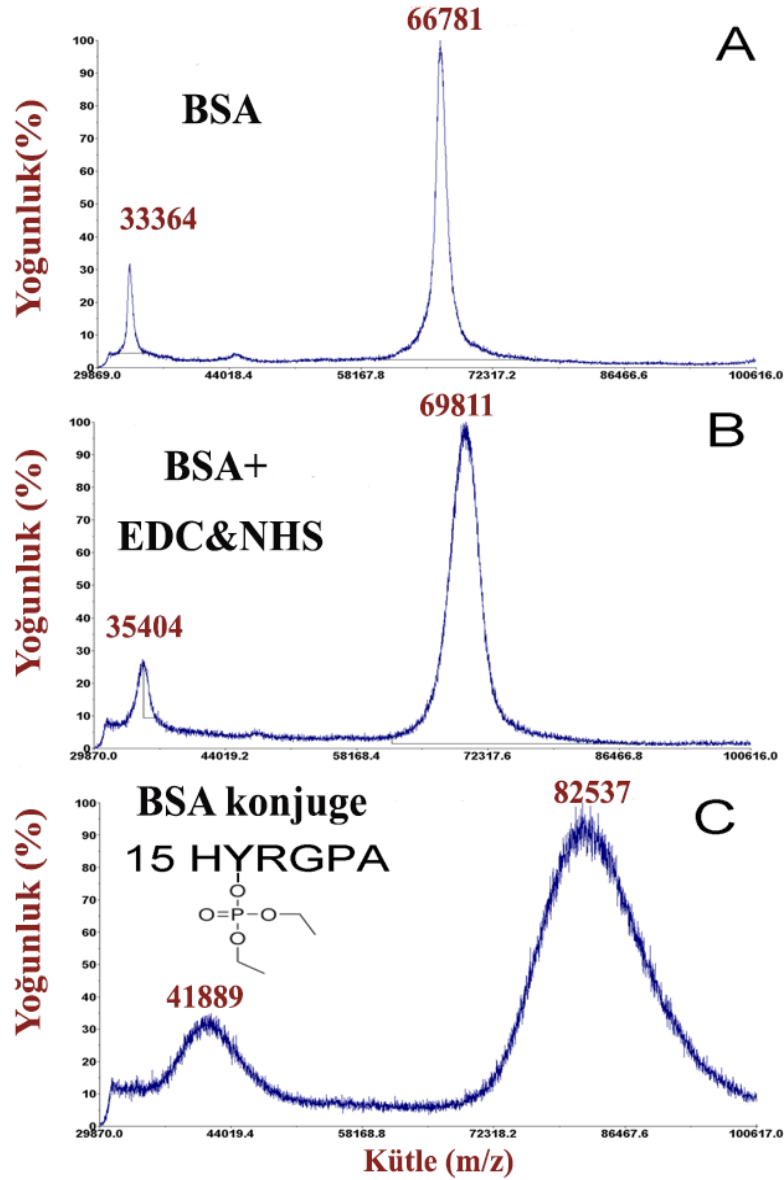
4. BULGULAR

4.1. OP-Peptitlerin Soğurma Katsayıları

Aromatik amino asit olarak sadece tirozin amino asidi içeren ve OP ile modifiye olmayan peptitler için, 275 nm’de maksimum absorbans piki gözlemlendi ve 1 cm’lik kuvarz küvet içerisinde 1 M peptit çözeltisinin absorbansı, 1500 olarak belirlendi. Tirozin amino asidi üzerinden OP ile işaretlenen aynı peptitler için 265 nm’de maksimum absorbans piki gözlemlendi ve 1 cm’lik kuvarz küvet içerisinde 1 M peptit çözeltisinin absorbansı 430 olarak ölçüldü.

4.2. Taşıyıcı Proteinlere Konjuge Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitlerin ve Kontrol Peptitlerin Sayısı

Taşıyıcı proteinlere bağlanan dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin (Tablo 4.1.) ve kontrol peptitlerin sayısı (Tablo 4.2.), MALDI-TOF kütle spektrometri kullanılarak, taşıyıcı proteinlerde gözlenen kütle değişimi ile belirlendi (134). Şekil 4.1.’de kütle spektrometri ile BSA’ya konjuge dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin sayısını saptama yöntemi gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Kütle spektrometri ile BSA'ya konjuge dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin sayısının belirlenmesi.

- Tek proton (66781 Da) ve çift proton (33364 Da) ile yüklenmiş BSA'ya ilişkin pikler.
- EDC ve sülfoNHS çapraz bağlayıcı ajanların varlığında gözlenen BSA pikleri.
- BSA'ya konjuge dietoksifosfotirozin modifiye HYRGPA peptidine ilişkin pikler. Panel B (69811 Da) ve Panel C'de (82537 Da) gözlenen BSA kütle farkı (12726 Da), dietoksifosfotirozin modifiye HYRGPA peptit kütlelerine (835 Da) bölünerek, BSA molekülüne bağlanan peptit sayısının 15 olduğu bulundu.

Tablo 4.1. Taşıyıcı proteine konjuge dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin sayısı.

Protein	Dietoksifosfotirozin modifiye peptit	Taşıyıcı proteine bağlanan peptit sayısı
BSA	LYGLPR	16
BSA	KYA	19
BSA	PVYSR	16
BSA	HYRGPA	15
BSA	EPNVSY	10
Ovalbümin	RSLYAS	18, 22
Ovalbümin	YGGFL	9, 5, 12
Ovalbümin	YPF	10, 6, 14
HSA	PPYRM	22
HSA	QYDVRK	7
HSA	YGGFL	5
Lizozim	RARYEM	6,9
Lizozim	GGYR	4, 10,16
Lizozim	KYK	1, 5, 9, 15
Lizozim	PYYMRR	1

Tablo 4.2. Taşıyıcı proteine konjuge kontrol peptitlerin sayısı.

Protein	Kontrol peptit	Taşıyıcı proteine bağlanan peptit sayısı
HSA	YGGFL	5
HSA	QYDVRK	7
Lizozim	PYYMRR	1
BSA	LYGLPR	16
Ovalbümin	RSLYAS	18, 22

4.3. Klorprifos Okson ile Muamele Edilen Proteinlerde Modifiye Olan Amino Asitler ve Miktarları

Saf proteinler (0.5 mg/ml), 1.5 mM CPO ile muamele edildikten sonra triptik peptitler, Triple TOF 6600 LC-MS/MS ile analiz edildi. Modifiye amino asitlerin, modifikasyon yüzdeleri Tablo 4.3-Tablo 4.14.'de özetlendi.

4.3.1. İnsan Albümini

Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile CPO ile muamele edilen insan albümini için (Şekil 4.2.) dietoksifosfat ile modifiye 4 adet tirozin ve 8 adet lizin amino asidi tanımlandı (Tablo 4.3.).

1	MKWVTFISLL	FLFSSAYSRG	VFRRDAHKSE	VAHRFKDLGE	ENFKALVLIA	FAQYLQCCPF			
61	EDHVKLNEV	TEFAKTCVAD	ESAENCDKSL	HTLFGDKLCT	VATLRETYGE	MADCCAKQEP			
121	ERNECFLQH	DDNPNLPRLV	RPEVDVMCTA	FHDNEETFLK	KLYEIAARRH	PYFYAPELLF			
181	FAKRY	KAAFT	ECCQAADKAA	CLLPKLDEL	DEGKASSAKQ	RLKASLQKF	GERAFKAWAV		
241	ARLSQRFPKA	EFAEVSKLVT	DLTKVHTECC	HGDLLECADD	RADLAKYICE	NQDSISSKLLK			
301	ECCEKPLLEK	SHCIAEVEND	EMPADLPSLA	ADFVESKDVC	KNYAEAKDVF	LGMFLYEYAR			
361	RHPDYSVLL	LRLAKTYETT	LEKCCAAADP	HECYAKVFDE	FKPLVEEPQN	LIKQNCLEFE			
421	QLGE	YKFQNA	LLVR	YTK	KVP	QVSTPTLVEV	SRNLGKVGSK	CCKHPEAKRM	PCAEDYLSVV
481	LNQLCVLHEK	TPVSDRVTKC	CTESLVNRRP	CFSALEVDET	YVPKEFNAET	FTFHADICTL			
541	SEKERQIKKQ	TALVELVKHK	PKAT	K	EQLKA	VMDDFAAFVE	KCKKADDKET	CFAEEGKKLV	
601	AASQAALGL								

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.2. İnsan albüminin (P02768) amino asit dizisi.

Tablo 4.3. İnsan albümini için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y162	21
Y174	2
Y425	5
Y435	98
K130	14
K186	16
K214	67
K223	85
K236	40
K438	4
K455	100
K565	33

4.3.2. Fare Albümini

Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile CPO ile muamele edilen fare albümini (Şekil 4.3.) için dietoksifosfat ile modifiye 1 adet tirozin ve 6 adet lizin amino asidi tanımlandı (Tablo 4.4.).

1	MKWVTFLLLL	FVSGSAFSRG	VFRREAHKSE	IAHRYNDLGE	QHFKGLVLIA	FSQYLQKCSY
61	DEHAKLVQEV	TDFAKTCVAD	ESAANCDKSL	HTLFGDKLCA	IPNLRENYGE	LADCCTKQEP
121	ERNECFLQHK	DDNPSLPPFE	RPEAEAMCTS	FKENPTTFMG	HYLHEVARRH	PYFYAPELLY
181	YAEQYNEILT	QCCAEADKES	CLTPKLDGV	E	KALVSSVRQ	RM
241	ARLSQTFPNA	DFAEITKLAT	DLTKVNKECC	HGDLLCADD	RAELAKYMCE	NQATISSKLQ
301	TCCDKPLLKK	AHCLSEVEHD	TMPADLPAIA	ADFVEDQVC	KNYAEAKDVF	LGTFLYEYSR
361	RHPDYSVSL	LRLAK	YEAT	LEKCCAEANP	PACYGTVLAE	FQPLVEEPKN
421	KLGEYGFQNA	ILVR	TQKAP	QVSTPTLVEA	ARNLGRVGT	CCTLPEDQRL
481	LNRVCLLHEK	TPVSEHVTKC	CSGSLVERRP	CFSALTVDET	YVPKEFKAET	FTFHSDICTL
541	PEKEKQIKKQ	TALAEVLKHK	PKATAEQLKT	VMDDFAQFLD	TCCAADKDT	CFSTEGPNLV
601	TRCKDALA					

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.3. Fare albüminin (P07724) amino asit dizisi.

Tablo 4.4. Fare albümini için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y435	83
K210	85
K212	14
K223	100
K236	40
K376	11
K460	43

4.3.3. Aprotinin

Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile CPO ile muamele edilen sığır pankreas tripsin inhibitörü, aprotinin (Şekil 4.4.) için dietoksifosfat ile modifiye edilen 1 adet tirozin ve 1 adet lizin amino asidi tanımlandı (Tablo 4.5.).

1 MSRLSLKTSG DEENWVSRFR SKSLSLVFSG VLALGLSLSG VGFADARPDF CLEPP^YTGPC
61 KARIIRYFYN AKAGLCQTFV YGGCRAKRNN F^KSAEDCMRT CGGA

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.4. Sığır Aprotininin (P00974) amino asit dizisi.

Tablo 4.5. Aprotinin için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y56	10
K92	65

4.3.4. Kazein

Kazein, alfa S1, alfa S2, beta ve kappa izoformlarından oluşan bir karışımdır. Her izoform farklı sayıda fosfoerin amino asidi içermektedir ve bu fosforilasyon modifikasyonları doğal olarak gerçekleşmektedir. Bu çalışmada, kazein izoformları için LC-MS/MS analizi ile tanımlanan fosfoerinler yeşil renk ile gösterildi. Kazeinin CPO ile muamelesi sonrasında sadece tirozin amino asitleri dietoksifosfat ile işaretlendiği için, kazein, çalışmadaki en bilgilendirici CPO-modifiye proteindir. Diğer taraftan, insan albümini, fare albümini, sığır tübülini ve domuz tübülünü ise hem tirozin hem de lizin amino asitlerinden dietoksifosfat ile modifiye edildi.

Alfa S1 Kazein

CPO ile muamele edilen sığır kazeinin alfa S1 izoformu (Şekil 4.5.) için dietoksifosfat ile modifiye edilen 3 adet tirozin amino asidi belirlendi. Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile 1 adet fosfat ile işaretli serin tanımlandı (Tablo 4.6.).

1	MKLLILTCLV	AVALARPKHP	IKHQGLPQEV	LNENLLRFFV	APFPEVFGKE	KVNELSKDIG
61	SESTEDQAME	DIQMEAESI	SSSEQKHIQK	EDVPSERYLG	YLEQLLRLKK	YKVPQLEIVP
121	N ^S AEERLHSM	KEGIHAQQKE	PMIGVNQELA	Y ^F Y ^F PELFRQF	YQLDAYPSGA	WYYVPLGTQY
181	APSFSDIPNP	IGSENSEKTT	MPLW			

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile; fosforile serin yeşil renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.5. Alfa S1 kazein (P02662) izoformunun amino asit dizisi.

Tablo 4.6. Alfa S1 kazein için dietoksifosfat ile modifiye ve fosforile olan amino asitler.

Modifiye amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)	% Fosfat ile işaretlenme (+80 Da)
Y111	40	
Y151	9	
Y153	9	
S122		91

Alfa S2 Kazein

CPO ile muamele edilen alfa S2 kazein (Şekil 4.6.) için dietoksifosfat ile modifiye edilen 3 adet tirozin amino asidi tanımlandı. Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile fosfoserin gözlenmedi (Tablo 4.7.).

1	MKFFIFTCLL	AVALAKNTME	HVSSSEESII	SQETYQKEKN	MAINPSKENL	CSTFCKEVVR
61	NANEEYSIG	SSSEESAIVA	TEEVKITVDD	KH ^Y QKALNEI	NQF ^Y QKFPQY	LQYLYQGPIV
121	LNPWDQVKN	AVPITPTLNR	EQLSTSEENS	KKTVDMESTE	VFTKTKLKE	BEKNRLNFLK
181	KISQR ^Y QKFA	LPQYLKTVYQ	HQKAMKPWIQ	PKTKVIPYVR	YL	

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.6. Alfa S2 kazein (P02663) izoformunun amino asit dizisi.

Tablo 4.7. Alfa S2 kazein için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye Amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y93	5
Y104	17
Y186	95

Beta Kazein

Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile CPO ile muamele edilen beta kazein için (Şekil 4.7.) dietoksifosfat ile modifiye 1 adet tirozin ve 1 adet fosfoerin tanımlandı (Tablo 4.8.).

1	MKVLILACLV	ALALARELEE	LNVPGEIVES	LSSSEESITR	INKKIEKFQ	S	EEQQQTEDEL
61	QDKIHPFAQT	QSLVYPPFGP	IPNSLPQNIP	PLTQTPVVVP	PFLQPEVLGV	SKVKEAMAPK	
121	HKEMPPPKYP	VEPFTESQSL	TLTDVENLHL	PLLLLQSWMH	QPHQPLPPTV	MFPPQSVLSL	
181	SQSKVLPVPQ	KAVP	Y	PQRDM	PIQAFLLYQQ	PVLGPVRGPF	PIIV

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile; fosforile serin, yeşil renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.7. Beta kazein (P02666) izoformunun amino asit dizisi.**Tablo 4.8.** Beta kazein için dietoksifosfat ile modifiye ve fosforile olan amino asitler.

Modifiye Amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)	% Fosfat ile işaretlenme (+80 Da)
Y195	10	
S50		87

Kappa Kazein

Kappa kazein için (Şekil 4.8) dietioksifosfat ile modifiye edilen 1 adet tirozin amino asidi tanımlandı. Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile fosforile amino asit gözlenmedi (Tablo 4.9.).

1	MMKSFFLVVT	ILALTLPFLG	AQEQNQEQPI	RCEKDERFFS	DKIAKYIPIQ	Y VLSRYPYSG
61	LNYYQQKPVA	LINNQFLPYP	YYAKPAAVRS	PAQILQWQVL	SNTVPAKSCQ	AQPTTMARHP
121	HPHLSFMAIP	PKKNQDKTEI	PTINTIASGE	PTSTPTTEAV	ESTVATLEDS	PEVIESPPEI
181	NTVQVTSTAV					

CPO ile muamele sonrasında dietioksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.8. Kappa kazein (P02668) izoformunun amino asit dizisi.

Tablo 4.9. Kappa kazein için dietioksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye Amino asit	% Dietioksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y51	50

4.3.5. Sığır Tübülin

Tübülin Alfa-1B Zincir

CPO ile muamele edilen sığır tübülünün alfa-1B zinciri (Şekil 4.9.), için Triple TOF 6600 kütle spektrometresi ile dietioksifosfat ile modifiye 1 adet tirozin amino asidi tanımlandı (Tablo 4.10.).

1	MRECISIHVG	QAGVQIGNAC	WELYCLEHGI	QPDGQMPSDK	TIGGGDDSFN	TFSETGAGK
61	HVPRAVFVDL	EPTVIDEVRT	GTYRQLFHPE	QLITGKEDAA	NNYARGHYTI	GKEIIDLVLD
121	RIRKLADQCT	GLQGFLVFHS	FGGGTGSQFT	SLLMERLSVD	YGKKSLEFS	IYPAPQVSTA
181	VVEPYNSILT	THTTLEHSDC	AFMVDNEAIY	DICRRNLDIE	RPTYTNLNL	ISQIVSSITA
241	SLRFDGALNV	DLTEFQTNLV	P PRIHFPLA	TYAPVISA EK	AYHEQLSVAE	ITNACFEPAN
301	QMKCDPRHG	KYMACCLLYR	GDVVPKDVNA	AIATIKTKRS	IQFVDWCPTG	FKVGINYQPP
361	TVVPGGDLAK	VQRAVCMLSN	TTAIAEAWAR	LDHKFDLMYA	KRAFVHWYVG	EGMEEGEFSE
421	AREDMAALEK	DYEEVGVDVSV	EGEGEEEGEE	Y		

CPO ile muamele sonrasında dietioksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.9. Sığır tübülün alfa-1B zincirinin (P81947) amino asit dizisi.

Tablo 4.10. Sığır túbülin alfa-1B zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye Amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y262	12

Túbülin Beta-4B Zincir

CPO ile muamele edilen sığır túbülinin beta-4B zinciri (Şekil 4.10.), için Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile dietoksifosfat ile modifiye 7 adet tirozin ve 1 adet lizin amino asidi tanımlandı (Tablo 4.11.).

1	MREIVHLQAG QCGNQIGAKF WEVISDEHGI DPTGTYHGDS DLQLERINV	Y	Y	NEATGGK	Y	V
61	PRAVLVDLEP GTMDSVRS GP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN WAKGH	Y	TEGA	ELVDSVLDVV		
121	RKEAESCDCL QGFQLTHSLG GGTGSGMGTL LISKIREEYP DRIMNTFSV V			PSPKVSDTVV		
181	EPYNATLSVH QLVENTDETY CIDNEAL	Y	DI	CFRTLKLTPP TYGDLNHLVS		ATMSGVTTCL
241	RFPGQLNADL RKLAVNMVPP PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRALTVPELT			QQMFDKNNMM		
301	AACDPRHGR	Y	LTVAAVFRGR MSMKEVDEQM LNVQKNSS	Y	FVEWIPNNVK TAVCDIPPRG	
361	LKMSATFIGN STAIQELFKR ISEQFTAMFR R	K	AFLHWYTG EGMDEMEFTE		AESNMNDLVS	
421	EYQQYQDATA EEEGEFEEEE EEEVA					

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.10. Sığır túbülin beta-4B zincirinin (E1B953) amino asit dizisi.

Tablo 4.11. Sığır túbülin beta-4B zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye Amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y50	18
Y51	15
Y59	21
Y106	4
Y208	26
Y310	23
Y340	19
K392	71

4.3.6. Domuz Tübülin

Tübülin Alfa-1A Zincir

CPO ile muamele edilen domuz tübülinin alfa-1A zinciri için (Şekil 4.11.) Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile dietoksifosfat ile modifiye 13 adet tirozin amino asidi ve 12 adet lizin amino asidi tanımlandı (Tablo 4.12.).

1	MRECISIHVG	QAGVQIGNAC	WELYCLEHGI	QPDGQMPSDK	TIGGGDDSFN	TFFSETGAGK
61	HVPRAVFVDL	EPTVIDEVRT	GT ^Y RQLFHPE	QLITG ^K EDAA	NN ^Y ARGH ^Y TI	G ^K EIIDLVLD
121	RIRKLADQCT	GLQGFSVFHS	FGGGTGSGFT	SLLMERLSVD	^Y G ^K ^K S ^K LEFS	I ^Y PAPQVSTA
181	VVEPYNSILT	THTTLEHSDC	AFMVDNEAIY	DICRRNLDIE	RPT ^Y TNLNRL	IGQIVSSITA
241	SLRFDGALNV	DLTEFQTNLV	P ^Y PRAHFPLA	T ^Y APVISA EK	A ^Y HEQLSVAE	ITNACFEPAN
301	QMVKCDPRHG	^K ^Y MACCLLYR	GDVVP ^K DVNA	AIATI ^K ^K RT	IQFVDWCPTG	FKVGIN ^Y EPP
361	TVVPGGDLA ^K	VQRAVCMLSN	TTAIAEAWAR	LDH ^K FDLM ^Y A	^K RAFVHW ^Y VG	EGMEEGEFSE
421	AREDMAALEK	DYEEVGVDSV	EGEGEEEGEE	Y		

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.11. Domuz tübülin alfa-1A zincirinin (P02550) amino asit dizisi.

Tablo 4.12. Domuz túbülin alfa-1A zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye Amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretleme (+136 Da)
Y83	9
Y103	69
Y108	42
Y161	43
Y172	14
Y224	19
Y262	16
Y272	37
Y282	10
Y312	45
Y357	7
Y399	16
Y408	18
K96	16
K112	21
K163	27
K164	24
K166	17
K311	55
K326	41
K336	11
K338	8
K370	30
K394	33
K401	38

Tübülin Alfa-1B Zincir

CPO ile muamele edilen domuz tübülünün alfa-1B zinciri için (Şekil 4.12.)

Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile dietoksifosfat ile modifiye 13 adet tirozin amino asidi ve 12 adet lizin amino asidi tanımlandı (Tablo 4.13.).

1	MRECISIHVG	QAGVQIGNAC	WELYCLEHGI	QPDGQMPSDK	TIGGGDDSFN	TFFSETGAGK
61	HVPRAVFDL	EPTVIDEVRT	GT ^Y RQLFHPE	QLITG ^K EDAA	NN ^Y ARGH ^Y TI	G ^K EIIDLVLD
121	RIRKLADQCT	GLQGFLVFHS	FGGGTGSQFT	SLLMERLSVD	^Y G ^K K ^K SKLEFS	I ^Y PAPQVSTA
181	VVEPYNILT	THTTLEHSDC	AFMVDNEAIY	DICRRNLDIE	RPT ^Y TNLNRL	ISQIVSSITA
241	SLRFDGALNV	DLTEFQTNLV	P ^Y PRIHFPLA	T ^Y APVISA EK	A ^Y HEQLSVAE	ITNACFEPAN
301	QMVKCDPRHG	^K Y ^Y MACCLLYR	GDVVP ^K DVNA	AIATI ^K T ^K K ^K RS	IQFVDWCPTG	F ^K VGIN ^Y QPP
361	TVVPGGDLA ^K	VQRAVCMLSN	TTAIAEAWAR	LDH ^K F ^K DLM ^Y A	^K R ^K AFVHW ^Y VG	EGMEEGEFSE
421	AREDMAALEK	DYEEVGVDVSV	EGEGEEEGEE	Y		

CPO ile muamele sonrasında dietoksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.12. Domuz tübülün alfa-1B zincirinin (Q2XVP4) amino asit dizisi.

Tablo 4.13. Domuz tübülün alfa-1B zinciri için dietoksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye Amino asit	% Dietoksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y83	6
Y103	67
Y108	17
Y161	28
Y172	25
Y224	27
Y262	27
Y272	31
Y282	27
Y312	45
Y357	7
Y399	33
Y408	18
K96	16
K112	25
K163	30
K164	14
K311	55
K326	8
K336	4
K338	6
K352	71
K370	19
K394	48
K401	60

Tübülin Beta Zincir

CPO ile muamele edilen domuz túbülinin beta zinciri için (Şekil 4.13.) Triple TOF 6600 kütle spektrometre ile dietioksifosfat ile modifiye 8 adet tirozin amino asidi ve 7 adet lizin amino asidi tanımlandı (Tablo 4.14.).

1	MREIVHIQAG	QCGNQIGAKF	WEVISDEHGI	DPTGTYHGDS	DLQLDRISVY	YNEATGGK	V
61	PRAILVDLEP	GTMDSVRS GP	FGQIFRPDNF	VFGQSGAGNN	WAKGH	TEGA	ELVDSVLDVV
121	RKEAESCDCL	QGFQLTHSLG	GGTGSGMGTL	LISK	IREE	P	DRIMNTFSVV
181	EP	NATLSVH	QLVENTDETY	CIDNEALYDI	CFRTL	L	TYGDLNHLVS
241	RFPGQLNADL	R	LAVNMVFP	PRLHFFMPGF	APLTSRGSQQ	Y	RALTVPELT
301	AACDPRHGR	Y	LTVAAVFRGR	MSMKEVDEQM	LNQKNSS	Y	FVEWIPNNVK
361	LKMAVTFIGN	STAIQELF	K	ISEQFTAMFR	R	AFLHW	Y
421	EYQYQDATA	EEEEDFGEEA	EEEE				

CPO ile muamele sonrasında dietioksifosfat ile işaretli amino asitler, kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 4.13. Domuz túbülin beta zincirinin (Q767L7) amino asit dizisi.

Tablo 4.14. Domuz túbülin beta zinciri için dietioksifosfat ile modifiye amino asitler.

Modifiye Amino asit	% Dietioksifosfat ile işaretlenme (+136 Da)
Y59	8
Y106	12
Y159	27
Y183	7
Y281	22
Y310	35
Y340	46
Y398	36
K103	24
K154	23
K216	50
K252	14
K324	15
K379	11
K392	100

4.4. DepY Monoklonal Antikor İzotipi

Protein G-agaroz ile saflaştırılan depY antikorunu, tripsinize edildikten sonra Triple-TOF 6600 LC-MS/MS ile analiz edildi. Kütle spektrometri sonuçları, IgG2a ağır zincir sabit bölgesine ilişkin (P01865) 670 adet peptidin ve IgG1 ağır zincir sabit bölgesine (P01869) ilişkin 318 adet peptidin varlığını gösterdi. Ayrıca Ig kappa hafif zincir sabit bölgesine (P01837) ait 157 peptit tespit edildi. Sonuç olarak depY monoklonal antikorun, IgG2a kappa ve IgG1 kappa izotip karışımından oluştuğu bulundu.

4.5. DepY Monoklonal Antikor Farklı Amino Asit Dizisine Sahip Dietoksifosfotirozin Modifiye Proteinleri Tanımlanmaktadır

30 adet hibridoma kültür ortamı ile gerçekleştirilen ilk ELISA sonuçları, sadece 4 klonun, CPO-insan albümini ve CPO-fare albümini için anlamlı sinyaller verdiğini gösterdi. Negatif kontrol olarak kullanılan kontrol insan albümini ve fare albümini için ise herhangi bir sinyal gözlenmedi. ELISA'da 405 nm'deki absorbans değerinin 0.2-0.4 aralığında olması anlamlı bir sinyali ifade ederken, aynı koşullar altında gözlenen 0.07-0.09 aralığındaki arka plan absorbans değeri, antijen-antikor arasında herhangi bir etkileşimin olmadığını düşündürdü. Dolayısıyla çalışmada dört hibridoma kültür ortamından elde edilen monoklonal antikorlar saflaştırıldı, farklı dietoksifosfotirozin proteinlerine karşı test edildi. ELISA sonuçları, 3B9 klonun (depY monoklonal antikorunu), diğer 3 klona göre daha yoğun sinyal verdiğini gösterdi. Bu nedenle daha sonraki aşamalarda depY antikorunu kullanılarak detaylı karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

DepY antikor, taşıyıcı proteine konjuge dietoksifosfotirozin modifiye peptitler ve dietoksifosfotirozin modifiye proteinler kullanılarak analiz edildi. ELISA ve Western blot sonuçları, depY'nin, amino asit dizisinden bağımsız olarak, dietoksifosfotirozin içeren peptitleri ve proteinleri tanıdığını gösterdi. (Tablo 4.15.). CPO ile modifiye edilmiş proteinlerde % dietoksifosfotirozin düzeyi için bir aralık verildi. Bunun nedeni, bir proteinde bazı tirozin amino asitleri daha fazla modifiye olurken, diğer tirozinler minimal düzeyde modifiye olmaktadır. Örneğin, CPO ile muamele sonrasında, domuz tübülün alfa-1A zincirindeki 13 tirozin amino asidinin dietoksifosfat ile modifiye edildiği; Tyr 357 için % 7, Tyr103 için ise % 69 oranında

modifikasyonun gözleendiği bulundu (Bkz. Tablo 4.12.). Benzer şekilde, domuz tübülün alfa-1B zincirinde de 13 tirozin amino asidi modifiye oldu. Tyr83 için % 6; Tyr103 için ise % 67 oranında modifikasyon gözleendi (Bkz. Tablo 4.13.). Ayrıca taşıyıcı protein molekülü başına çapraz bağlanmış dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerinin sayısı ile ELISA'da gözlenen sinyal yoğunluğu arasında da kaba bir korelasyon görüldü (Tablo 4.15.). Örneğin, lizozim molekülü başına bağlanan 1 dietoksifosfotirozin modifiye peptit (lizozim-PYYMRR-DEP) aynı proteine bağlı 4 dietoksifosfotirozin modifiye peptite (lizozim-GGYR-DEP) göre daha az sinyal verdi.

CPO ile modifiye edilen saf proteinler için de benzer bir korelasyon gözleendi. Örneğin, CPO ile muamele sonrasında sığır aprotininde bulunan 4 tirozin amino asidinden sadece birinde dietoksifosfat modifikasyonu gözleendi ve sadece Tyr 56'nın % 10'u dietoksifosfat ile modifiye oldu (Bkz. Tablo 4.5.). Diğer taraftan, domuz tübülün α -zincirlerindeki 19 tirozin amino asidinden 13'ü (Bkz. Tablo 4.12- Tablo 4.13.) ve domuz tübülün β -zincirlerindeki 16 tirozin amino asidinden 8'i (Bkz. Tablo 4.14.) üzerinde dietoksifosfat modifikasyonu gözleendi ve modifikasyon derecesi % 6 ile % 69 arasında değiştii. Western blot sonuçları, sinyal yoğunluğunun CPO-tübülün için oldukça yüksek olduğunu, CPO-aprotinin için ise düşük olduğunu gösterdi.

Kazeinde bulunan serin ve treonin amino asitleri doğal olarak fosforile olmaktadır. PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/>) veri tabanında kazein izozimleri için toplam 34 fosfo-serin ve fosfo-treonin bölgesi gösterilmektedir. ELISA ve Western Blot analizleri ile depY monoklonal antikorun, kontrol kazein için sinyal vermediği bulundu (Tablo 4.18). Bu durum, depY antikorun fosfo-serin ve fosfo-treonin modifikasyonlarını tanımadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, depY monoklonal antikor, amino asit dizisinden bağımsız olarak tirozin üzerindeki dietoksifosfat modifikasyonunu tanımaktadır. Bu özellik, depY antikorunun herhangi bir türde, bilinmeyen proteinlerin tirozin amino asidi üzerinde oluşan dietoksifosfat eklenti ürünlerini tanımlamak için kullanılmasını mümkün kılacaktır.

Tablo 4.15. DepY monoklonal antikorun, farklı amino asit dizisine sahip dietoksifosfotirozin modifiye proteinleri ve peptitleri tanınması.

Antijen	ELISA	Western blot	%DEP-Tyr ^a
HSA-QYDVRK-DEP	+++	++++	
HSA Kontrol	-	-	
HSA-YGGFL-DEP	+++	++++	
BSA-LYGLPR- DEP	+++	++++	
BSA Kontrol	-	-	
Lizozim-GGYR-DEP	++++	N/A	
Lizozim-RARYEM-DEP	++++	N/A	
Lizozim-PYYMRR-DEP	+++	++	
Lizozim kontrol	-	-	
Ovalbümin-RSLYAS-DEP	+++	N/A	
Ovalbümin-YPF-OP	++++	N/A	
Ovalbümin-YGGFL-DEP	++++	N/A	
Ovalbümin Kontrol	-	N/A	
Kazein-DEP (DEP, Tyr üzerinde)	+++	+++	10-95%
Kazein kontrol	-	-	0
Sığır tübülini-DEP (DEP, Tyr ve Lys üzerinde)	+++	+++++	12-26%
Domuz tübülini kontrol	-	-	0
HSA-DEP (DEP, Tyr ve Lys üzerinde)	+	-	21- 98%
Aprotinin-DEP (DEP, Tyr ve Lys üzerinde)	++	+	10%
Aprotinin kontrol	-	-	0
Fare albümini-DEP (DEP, Tyr ve Lys üzerinde)	+++	N/A	83%
Fare albümini kontrol	-	N/A	0

DEP, dietoksifosfat eklentisini ifade etmektedir. Dietoksifosfat eklentisi, peptitler ve kazein içinde sadece tirozin üzerindedir. Dietoksifosfat eklentisi, insan albümin, sığır tübülün, domuz tübülün, lizozim ve aprotinin proteinlerinde hem tirozin hem de lizin üzerindedir. Ancak, depY dietoksifosfat-lizini tanımamaktadır. +, sinyal yoğunluğunu temsil etmektedir, çoklu pozitif semboller en yüksek sinyali, tek + işareti, en düşük pozitif sinyali temsil etmektedir. -, negatif sonucu, NA ise verinin olmadığını ifade etmektedir. ^a %DEP-Tyr her bir CPO-modifiye proteinde, tirozinlerin LC-MS/MS ile belirlenen dietoksifosfat modifikasyon yüzdesini ifade etmektedir.

4.6. DepY Monoklonal Antikor Dietoksifosfolizin Modifiye Proteinleri Tanımamaktadır

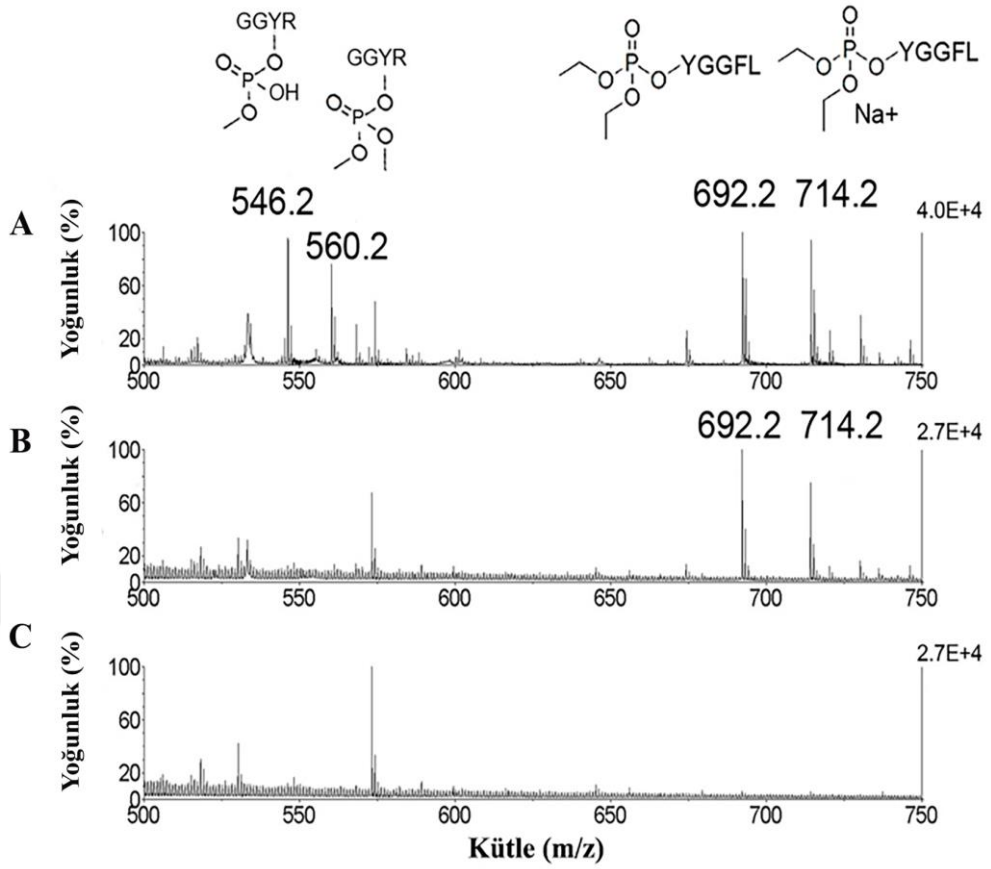
CPO ile muamele edilen proteinler hem tirozin hem de lizin amino asidi üzerinde dietoksifosfat eklenti ürünleri oluşturmaktadır. Dietoksifosfotirozine spesifik depY monoklonal antikorun, lizin amino asidi üzerindeki dietoksifosfat eklenti ürünlerini tanıyıp tanımadığını göstermek için, hazırlanan dietoksifosfo-L-lizin, insan serum albümini ile konjuge edildi. Kütle spektrometri sonuçları, hazırlanan konjugatta albümin molekülü başına 14 adet dietoksifosfolizinin bağlandığını gösterdi. 96-kuyulu plaklar, 1 µg HSA'ya konjuge dietoksifosfolizin antijeni ile kaplandı. Pozitif kontrol olarak, dietoksifosfat ile modifiye tübülün; negatif kontrol olarak, CPO ile muamele edilmemiş HSA kullanıldı. Çalışmada, depY monoklonal antikorun 10 kat daha yüksek konsantrasyonu kullanılmış olmasına rağmen, antikor, HSA'ya konjuge dietoksifosfolizini tanımadı. Sonuç olarak, depY antikoru, dietoksifosforillenmiş lizine herhangi bir spesifite göstermemektedir.

4.7. DepY Monoklonal Antikor CBDP, Diklorvos ve CPO Modifiye İnsan BChE'yi Tanımamaktadır

Çalışmada BChE örneği, tri-o-krezilfosfatın toksik metaboliti olan CBDP ile inhibe edilerek enzimin aktif bölgesindeki Ser198 üzerinde fosfoserin ve krezilfosfoserin eklenti ürünleri oluşturuldu (77, 138). Ayrıca BChE örneği, ayrı ayrı diklorvos ve CPO ile inhibe edildi ve BChE'nin aktif bölgesi üzerinde sırasıyla; dimetoksifosfat ve dietoksifosfat eklenti ürünleri oluşturuldu. İnhibe edilmiş BChE örnekleri kaynatıldı ve nativ proteinin aktif bölge içerisinde gömülü olan serin amino asidi ortaya çıkarıldı (139). Daha sonra kaynatılmış BChE örnekleri ile plaklar kaplandı ve depY monoklonal antikorun bu üç eklenti ürününe bağlanması ELISA ile değerlendirildi. Sonuç olarak, üç BChE örneği için depY monoklonal antikor ile ELISA sinyali gözlenmedi. Bu da, depY monoklonal antikorun fosfoserin, krezilfosfoserin, dietoksifosfoserin ve dimetoksifosfoserini tanımadığını göstermektedir.

4.8. DepY Monoklonal Antikor Diklorvos Modifiye Tirozini Tanımamaktadır

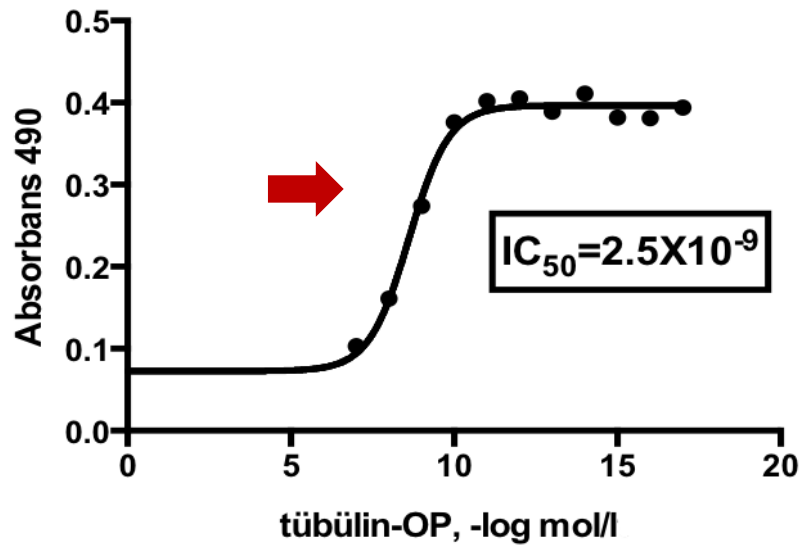
İki farklı organofosfat kullanılarak depY monoklonal antikorun, tirozin amino asidi üzerinde oluşan, iki farklı eklenti ürünü üzerindeki etkisini değerlendirmek için, depY-Sefaroz ve antikor içermeyen Sefaroz reçineler, diklorvos-modifiye GGYR ve CPO-modifiye YGGFL peptit karışımları ile inkübe edildi. Daha sonra Sefaroz reçineler, PBS ve su ile yıkandı, bağlı peptitler %50 asetonitril, %1 TFA ile elüe edilerek MALDI-TOF kütle spektrometre ile analiz edildi (Şekil 4.14.). Diklorvos ile muamele, tirozin üzerinden dimetoksifosfat eklentisini oluştururken, bunun bir kısmı yaşlanma reaksiyonu sonucunda monometoksifosfat eklenti ürününe dönüşmektedir. CPO ile muamele sonucunda ise tirozin üzerinden dietoksifosfat eklenti ürünü oluşmaktadır ve yaşlanma reaksiyonunun gerçekleşmemesi nedeni ile monoetoksifosfat eklenti ürünü gözlenmemektedir. Kütle spektrometri sonuçları, depY-Sefaroza sadece CPO ile modifiye edilmiş peptidin (tirozin üzerinden dietoksifosfat ile modifiye YGGFL) bağlandığını, diklorvos ile modifiye edilmiş peptidin (tirozin üzerinden dimetoksifosfat ve monometoksifosfat ile modifiye GGYR) ise depY-Sefaroza bağlanmadan, yıkama aşamalarında uzaklaştırıldığını gösterdi.



Şekil 4.14. CPO-modifiye YGGFL ve diklorvos-modifiye GGYR peptitler için depY monoklonal antikor ile immüno MALDI. A) DepY-Sefaroz ile inkübe edilmeden önce CPO-modifiye YGGFL ve diklorvos-modifiye GGYR peptit karışımı. Diklorvos-modifiye GGYR peptidi, 560.2 Da (dimetoksifosfo eklenti ürünü) ve 546.2 Da'da (yaşlanma; monometoksifosfo eklenti ürünü) iki yoğun pik verdi. CPO modifiye YGGFL peptidi ise 692.2 Da (dietoksifosfo eklenti ürünü) ve 714.2 Da'da (dietoksifosfo eklenti ürüne ait sodyum iyonu) iki yoğun pike neden oldu. B) CPO-modifiye YGGFL ve diklorvos-modifiye GGYR peptit karışımından, sadece dietoksifosfotirozin ile modifiye YGGFL peptidi, depY-Sefaroz'a bağlandı. Diklorvos modifiye peptit ise depY-Sefaroz'a bağlanmadı C) CPO-modifiye YGGFL ve diklorvos-modifiye GGYR peptit karışımı, antikor içermeyen sefaroz reçineye bağlanmadı.

4.9. Dietoksifosfotirozin Modifiye Domuz Tübülünün DepY Monoklonal Antikora Bağlanma Afinitesinin Yarışmalı ELISA ile Analizi

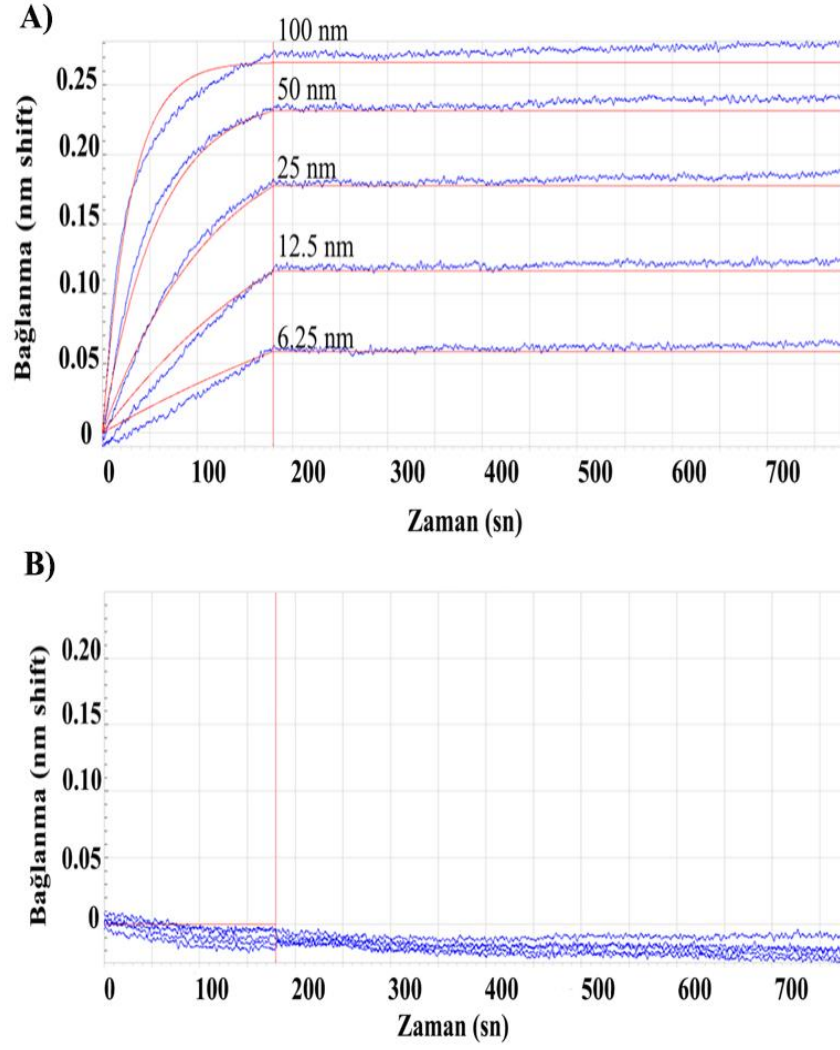
DepY antikorunu, 10^{-17} - 10^{-7} M domuz tübülün-DEP ile inkübe edildikten sonra, plaklardaki HSA-QYDVRK-DEP antijeninin, antikora bağlanması yarışmalı ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Sonuçlar, depY monoklonal antikorun ($0.1 \mu\text{g/ml}$), domuz tübülün-DEP'e ilişkin IC_{50} değerinin 2.5×10^{-9} M olduğunu gösterdi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. DepY'nin CPO modifiye domuz tübülün için bağlama afinitesi.

4.10. Dietoksifosfotirozin Modifiye Proteinlerin DepY Monoklonal Antikora Bağlanma Afinitesinin Bio-Layer İnterferometri ile Analizi

DepY antikorunu ile CPO-modifiye proteinler arasındaki reaksiyona ilişkin birleşme (k_{on}) ve ayrılma (k_{off}) hız sabitleri, bio-layer interferometri yöntemi kullanılarak OctetRED96 cihazında ölçüldü. Şekil 4.16 A ve Şekil 4.16 B'de sırasıyla; CPO ile modifiye domuz tübülün ve kontrol domuz tübülüne ilişkin bulgular verilmiştir. Sonuçlar, depY antikorun domuz tübülün-DEP, kazein-DEP, ovalbümin-YPF-DEP, BSA-LYGLPR-DEP için K_d değerlerinin (k_{on}/k_{off}) 1×10^{-12} M'den daha küçük olduğunu gösterdi. (Tablo 4.16.).



Şekil 4.16. DepY'nin bağlama afinitesinin bio-layer interferometri ile analizi. A) DepY'nin dietoksifosfat ile tirozinden modifiye edilen domuz tübülünü bağlama afinitesi. B) DepY'nin kontrol domuz tübülünü bağlama afinitesi.

Tablo 4.16. DepY'nin CPO-modifiye ve kontrol proteinleri bağlamasına ilişkin biolayer interferometri sonuçları.

Protein	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_d (M)	χ^2	R^2
Domuz tübülün-DEP	2.44×10^5	$<1 \times 10^{-7}$	$<1 \times 10^{-12}$	0.014	0.99
Domuz tübülün kontrol	NA	NA	Bağlanma yok	NA	NA
Kazein-DEP	1.82×10^5	$<1 \times 10^{-7}$	$<1 \times 10^{-12}$	0.004	0.97
Kazein kontrol	NA	NA	Bağlanma yok	NA	NA
Ovalbümin-YPF-DEP	1.40×10^5	$<1 \times 10^{-7}$	$<1 \times 10^{-12}$	0.027	0.96
Ovalbümin-YPF kontrol	NA	NA	Bağlanma yok	NA	NA
BSA-LYGLPR-DEP	2.08×10^5	$<1 \times 10^{-7}$	$<1 \times 10^{-12}$	0.176	0.93
BSA-LYGLPR kontrol	NA	NA	Bağlanma yok	NA	NA

χ^2 değerinin 1'den düşük olması istatistiksel olarak anlamlı olduğunu, NA uygulanabilir olmadığını ifade etmektedir.

4.11. Dietoksifosfotirozin Modifiye Peptitlerin DepY Monoklonal Antikora Bağlanma Afinitesinin Biacore ile Analizi

Dietoksifosfat ile tirozinden modifiye küçük peptitlerin, depY monoklonal antikora afiniteleri, Biacore cihazı ile ölçüldü ve K_d değerlerinin 10^{-7} - 10^{-8} M olduğu bulundu. Kontrol peptitler ise 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, % 0.05 polioksietilensorbitan içinde, depY antikora bağlanmadı (Tablo 4.17).

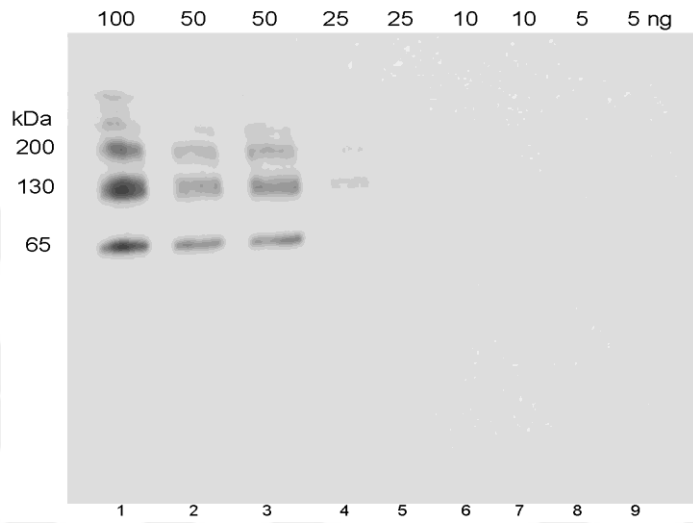
Tablo 4.17. Dietoksifosfotirozin modifiye peptitlerin depY monoklonal antikora bağlanma afinitesinin Biacore ile Analizi.

Peptit	K_d , M	χ^2
YPF-DEP	4.1×10^{-7}	0.0076
YPF kontrol	Bağlanma yok	-
GGYR-DEP	5.3×10^{-8}	0.506
GGYR kontrol	Bağlanma yok	-
LYGLPR-DEP	1.2×10^{-8}	0.0262
LYGLPR kontrol	Bağlanma yok	-
PPYRM-DEP	3.6×10^{-7}	0.361
PPYRM kontrol	Bağlanma yok	-

χ^2 değerinin 1'den düşük olması istatistiksel olarak anlamlı olduğunu, '-' χ^2 değerinin ölçülemeyecek kadar düşük olmadığını ifade etmektedir.

4.12. DepY Monoklonal Antikor ile Tanımlanabilen En Düşük Antijen Miktarının Belirlenmesi

Western blot analizi ile depY antikorun HSA-YGGFL-DEP antijenini 25 ng'a kadar tanıdığı ve bağladığı gösterildi. Şekil 4.17'de albümin konjugatının, 5 farklı bant verdiği gözlenmektedir. Bu durum, EDC'nin albümini dimer, trimer, tetramer ve pentamerleri oluşturmak üzere çapraz bağlamasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.17. DepY monoklonal antikor ile HSA'ya konjuge YGGFL-DEP peptidinin Western Blot görüntüsü. Albümin molekülüne 5 adet dietoksifosfotirozin modifiye YGGFL peptidi bağlıdır. SDS jelle 5-100 ng antijen yüklendi. Membran, 0.14 µg/ml depY monoklonal antikor ile inkübe edildi.

4.13. Anti-fosfo-L-tirozin Monoklonal Antikorun (PY20)

Dietoksifosfotirozin Modifiye Proteinleri Tanımamaktadır

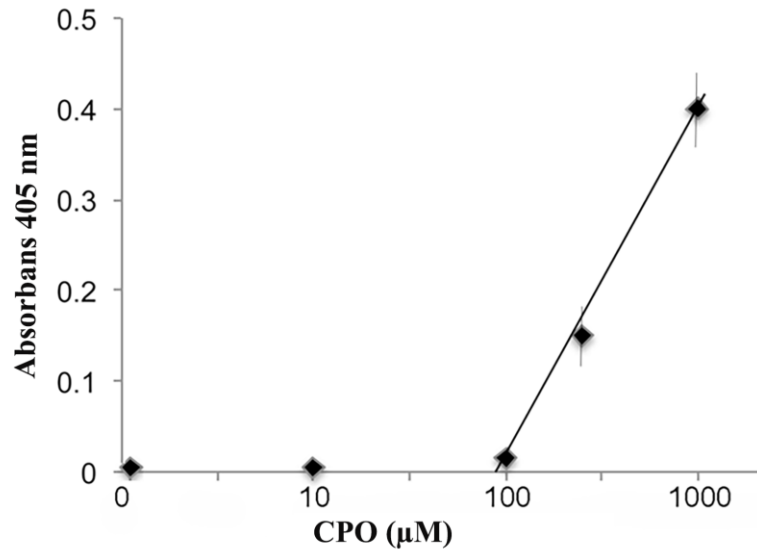
Hücrelerdeki proteinler, doğal olarak tirozin amino asidi üzerinden fosforilasyona uğramaktadır. Çalışmada fosforile tirozini tanıyan, ticari PY20 monoklonal antikorun, tirozinden dietoksifosfat ile modifiye proteinleri (Tübülin-DEP, Lizozim-PYMRR-DEP, BSA-LYGLPR-DEP, HSA-QYDVRK-DEP, HSA-YGGFL-DEP) tanıyıp tanımadığı test edildi. Çalışmada, HSA'ya konjuge O-fosfo-L-tirozin pozitif kontrol olarak; insan albümin ve domuz tübülin ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Western Blot sonuçları, PY20 monoklonal antikorun, tirozinden dietoksifosfat ile modifiye hiçbir proteini tanımadığını gösterdi (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Anti-fosfo-L-tirozin monoklonal antikor (PY20) ile Western Blot görüntüsü. SDS jelin her bir kuyucuğuna 1 µg protein yüklendi. 1. Lizozim-PYMRR-DEP, 2. BSA-LYGLPR-DEP, 3. HSA-QYDVRK-DEP, 4. HSA-YGGFL-DEP, 5. Kontrol HSA, 6. Tübülin-DEP, 7. Kontrol tübülin, 8. ve 9. HSA-O-fosfo-L-tirozin. Monoklonal antikor PY20, fosfotirozin ile işaretli proteini spesifik olarak tanırken, dietoksifosfotirozin modifiye proteinleri tanımamaktadır.

4.14. Klorprifos Okson ile Muamele Edilen HEK 293 Hücre Lizatlarının ELISA ile Analizi

CPO (0-1000 μM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatlarında, depY'nin (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CPO-modifiye proteinleri tanıyıp tanımadığı ELISA ile değerlendirildi. Şekil 4.19.'da hücre lizat örneklerini işaretlemede kullanılan CPO'nun konsantrasyonu, 100 μM 'dan 1000 μM 'a çıkarıldığında ELISA sinyalinin de progresif olarak arttığı görülmektedir. Ayrıca CPO ile muamele edilmeyen kontrol hücre lizatlarından (negatif kontrol) alınan sinyal, arka plan sinyali ile hemen hemen aynıydı. Bu da, nonspesifik olarak antijenin antikora bağlanmadığını ve monoklonal antikor depY'nin, hücre lizatlarındaki CPO ile modifiye olmuş proteinleri spesifik olarak bağladığını göstermektedir.



Şekil 4.19. DepY'nin CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatlarındaki proteinlerle etkileşiminin ELISA ile analizi. 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ depY monoklonal antikor kullanıldı. Veriler, dört ölçümün ortalaması \pm SD olarak gösterilmiştir.

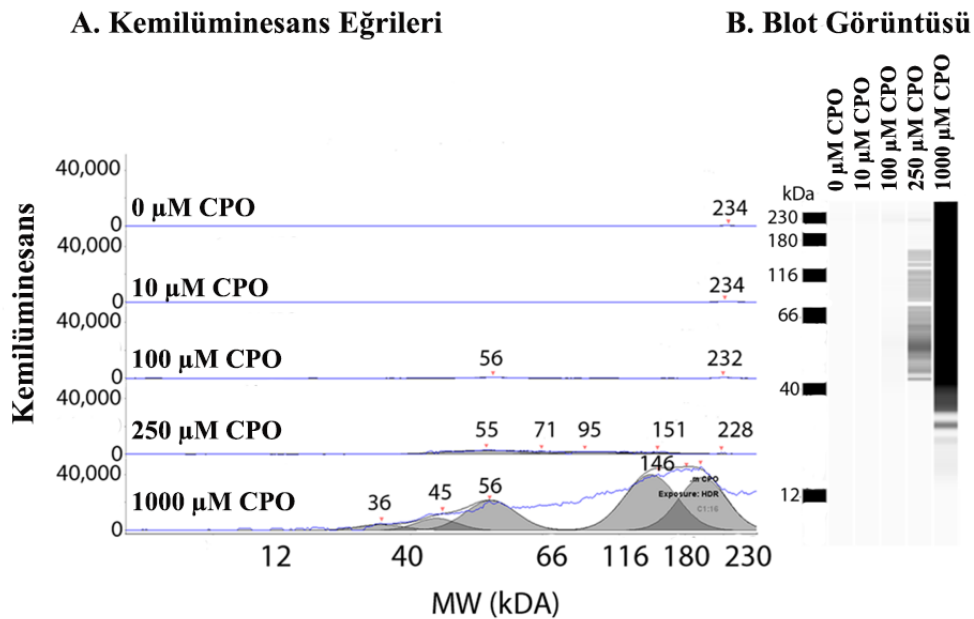
4.15. Klorprifos Okson ile Muamele Edilen HEK 293 Hücre Lizatlarının Kapiller Elektroferez- Western Blot ile Analizi

0-1000 μM CPO ile muamele edilen HEK 293 hücre lizatlarındaki proteinler, kapiller elektroferez ile ayrılarak, kapiller duvarda immobilize edildi. Daha sonra

depY antikoru ($0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) kapillerden geçirilerek depY'ye bağlanan proteinler analiz edildi. DepY'nin proteinler ile reaksiyonu, Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.

DepY, 0 ve $10 \mu\text{M}$ CPO ile muamele edilmiş hücre lizatlarında 234 kDa 'da zayıf bir sinyale neden olurken, $100 \mu\text{M}$ CPO ile muamele edilmiş hücre lizatlarında 56 kDa 'da zayıf bir sinyal verdi. Benzer şekilde; depY $250 \mu\text{M}$ CPO ile muamele edilmiş hücre lizatı ile 55 kDa , 71 kDa , 95 kDa , 151 kDa ve 228 kDa 'da zayıf sinyallere neden oldu. Diğer taraftan depY, $1000 \mu\text{M}$ CPO ile muamele edilen hücre lizatı ile, 36 kDa , 45 kDa , 56 kDa , 146 kDa , 172 kDa ve 202 kDa 'da güçlü sinyaller verdi.

Şekil 4.20A'daki kemilüminans verileri, Şekil 4.20B'de blot olarak gösterilmiştir. Kapiller elektroforez-Western blot sonuçları, ELISA sonuçlarını destekleyerek, depY'nin, CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatındaki modifiye proteinleri tanıdığını ve farklı moleküler ağırlığa sahip birçok proteinin, tirozin üzerinden dietoksifosforile olduğunu gösterdi. Bu sonuç, daha sonra kütle spektrometri sonuçları ile de doğrulandı.



Şekil 4.20. DepY'nin HEK 293 hücre lizatlarındaki dietoksifosfotirozin modifiye proteinler ile etkileşiminin kapiller elektroforez-Western blot ile Analizi. 40 nl 'de $0.008 \mu\text{g}$ protein içeren örnekler, monoklonal antikor depY ($0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) ile hibritlendi.

4.16. Klorprifos Okson ile Muamele Edilen HEK 293 Hücre Lizatlarının LC-MS/MS Kütle Spektrometri ile Analizi

ELISA ve Western blot sonuçları, CPO ile muamele edilmiş hücre lizat proteinlerinin tirozin üzerinden modifiye edildiğine dair kanıt sağlamaktadır. Çalışmada bir sonraki hedef, CPO-modifiye proteinlerin kimliğinin belirlenmesi idi. Bunun için CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatları, tripsinize edildi ve elde edilen triptik peptit iki farklı kütle spektrometre ile analiz edildi.

1000 μ M CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatına ilişkin triptik peptitler, depY ile immünopürifiye edildiğinde, 73 farklı proteine ait toplam 116 farklı dietoksifosfotirozin içeren peptit tanımlandı (Tablo 4.18.). Bu peptitlerin listesi, Protein Pilot \geq %90 kesinlik skoru ve Sequest HT Posterior Hata Olasılığı (PEP) skoru \leq 0.01 kullanılarak sınırlandırıldı. Triple TOF/Protein Pilot ile 23 proteine ait 40 dietoksifosfotirozin içeren peptit tespit edilirken, OrbiTrap/Proteome Discoverer ile 68 proteine ait 100 dietoksifosfotirozin içeren peptit belirlendi. Ayrıca 24 adet dietoksifosfotirozin içeren peptitler, her iki analizde de ortak.

OrbiTrap LC-MS/MS için örnek, 5 μ l'de 1 μ g triptik peptit içerirken, Triple TOF LC-MS/MS için örnek 5 μ l'de 50 μ g triptik peptit içermekteydi. OrbiTrap ile, Triple TOF kütle spektrometresine göre daha fazla dietoksifosforile peptit tanımlandı.

1000 μ M CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatına ilişkin triptik peptitler depY ile immünopürifiye edilmediğinde, Triple TOF kütle spektrometresi ile 6 farklı proteine ait sadece 7 dietoksifosfotirozin içeren peptit tanımlanırken, OrbiTrap ile 6 farklı proteine ait 8 dietoksifosfotirozin içeren peptit tanımlandı. Ayrıca Triple TOF ile 1 dietoksifosfolizin içeren peptit ve Orbitrap ile 3 dietoksifosfolizin içeren peptit belirlendi (Tablo 4.18.). Toplamda, 14 proteine ait 18 dietoksifosforillenmiş peptit tanımlandı.

Sonuçlar, depY'nin dietoksifosfotirozin için özgülüğünü yansıtmaktadır ve dietoksifosfolizin ve dietoksifosfoserin modifikasyonlarını da tanımadığını göstermektedir. Ayrıca depY, kompleks bir karışımda dietoksifosfotirozin içeren peptitleri zenginleştirerek kolayca tanımlanabilmesine de imkan sağlamaktadır. DepY uygulaması olmadan, 1000 μ M CPO ile muamele edilen HEK 293 hücre lizatının triptik peptitleri, Triple TOF kütle spektrometresi ile analiz edildiğinde; \geq %90 kesinlik skoru ile toplam 44.921 peptit saptandı. Bu sayı, tüm veri içerisinde birden fazla

görünen peptitleri de içermektedir. Bu peptitlerin 29'u üzerinde dietoksifosfotirozin modifikasyonu gözlemlendi. Diğer taraftan, triptik parçalanma sonrasında karışım, depY ile immünopürifiye edildiğinde ise, \geq %90 kesinlik skoru ile toplam 629 peptit tespit edildi, bunların 109'u üzerinde dietoksifosfotirozin modifikasyonu gözlemlendi. DepY ekstraksiyonu olmadan, toplam peptitlerin % 0.06'sında dietoksifosfotirozin modifikasyonu gözlemlendi [$29 \div 44.921 \times 100$]. DepY ekstraksiyonu ile peptitlerin % 17'si üzerinde dietoksifosfotirozin modifikasyonu [$109 \div 629 \times 100$] ve 280 kat artış [$17 \div 0.06$] gözlemlendi. DepY ile pürifiye edilen örnekte toplam peptit sayısı, ekstraksiyona tabi tutulmamış örnekten 70 kat daha düşüktü [$44.921 \div 629$].

HEK 293 proteomunda etiketlenmiş herbir proteinin göreceli bulunma bolluğu, Tablo 4.18'de, sırasıyla gösterilmiştir. Sıralama, herbir protein için iBAQ sayısına (yoğunluk temelli mutlak nicelik) göre yapılmıştır. (142). Geiger ve ark. tarafından yapılan çalışmada 6858 adet HEK 293 hücre proteini sıralanmıştır (140). Bu sıralamaya göre, en çok bulunan protein ilk sırada ve en az bulunan protein ise 6858. sırada yer almıştır.

Tablo 4.18, çalışmada tanımlanan çoğu proteinin, 1 ile 200. sıra arasında olduğunu, (en üst % 3), 7 proteinin ise 1000. sıranın üzerinde (% 14'ün altında) bulunduğunu işaret etmektedir. Bu sonuç, özellikle daha bol bulunan proteinler üzerinde dietoksifosfat modifikasyonunun tanımlandığını göstermektedir.

250 ve 10 μ M CPO ile muamele edilen örnekler için de benzer sonuçlar elde edildi (Tablo 4.19 ve Tablo 4.20.).

Herbir modifiye peptidin kütle spektrumunun kaydedilme sayısı, yani peptit sayısı, triptik parçalanma sonucunda bulunan her modifiye peptidin relatif miktarının bir ölçüsüdür. Triple TOF verilerinde, modifikasyon için kullanılan CPO'nun konsantrasyonu azaldıkça modifiye peptitlerin sayısı da azalmaktadır. 10 μ M CPO ile muamele edilen hücre lizatında histon H4 (P62805) ve histon H1.4 (P10412) proteinlerine ait sadece iki dietoksifosfotirozin peptit tespit edildi.

Tablo 4.18. CPO (1 mM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizati içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler^a

Protein	Erişim #	Peptit dizisi ^b	Sıra ^c	Fosforilasyon yeri ^d	
				+/-	aa ^e
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	DSYVGD EA QSK	1710	+	Y53
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	DLTDY LM K	1710	+	Y188
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	GYSF TTA ER	1710	+	Y198
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	QEYDESGPSIV HR	1710	+	Y362
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	SYELPDGGQVIT IGNER	1710	+	Y240
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	DLYANTVLSGGTTMY PGIADR	1710	+	Y294
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	IWHHTFY NELR	1710	+	Y91
Aktin, alfa kardiyak kas 1	P68032	YPIEHG ITNW DDMoxEK	156	+	Y71
ADP/ATP translokaz 2	P05141	YFPTQALN FAFK	101	+	Y81
Poli [ADP-riboz] polimeraz 1	P09874	FYTLIPHDFGMox K	151	+	Y737
Adenin fosforibozil transferaz	P07741-1	IDYIAG LDSR	392	+	Y60
Alfa-enolaz	P06733	AAVPSG ASTGI YE ALELR	14	+	Y44
Alfa-enolaz	P06733	IGAEV YHNLK	14	+	Y189
Alfa-enolaz	P06733	AGYTDKVVIGMDV AASEFFR	14	+	Y236
Alfa-enolaz	P06733	YISPDQL ADLYK	14	+	Y270
Alfa-enolaz	P06733	DYPVV SIEDP FQDDWGAW QK	14	+	Y287
ATP sentaz subunit alfa, mitokondrial	P25705-1	EAYPGD VFY L HSR	225	+	Y337
				+	Y343
ATP sentaz subunit beta, mitokondrial	P06576	IMDPN IVGSEHYD VAR	141	+	Y418
ATP sentaz subunit gama, mitokondrial	P36542-1	IYGL SLAL YE K	637	-	Y69
Calpain küçük subunit 1	P04632	Y S DESGNMoxDFDN FIS CamL V R	1390	-	Y217
Kofilin-1	P23528	EILVGD V GQTVDD PY AT FVK	25	+	Y68
Kofilin-1	P23528	HELQAN CY EE VK	25	+	Y140

Tablo 4.18. (Devam) CPO (1 mM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler^a

Protein	Erişim #	Peptit dizisi ^b	Sıra ^c	Fosforilasyon yeri ^d	
				+/-	aa ^e
Koflin-1	P23528	<u>Y</u> ALYDATY <u>Y</u> ETK	25	+	Y82 Y85 Y89
Elongasyon faktör 1-alfa 1	P68104	<u>Y</u> YVTHIDAPGHR	8	+	Y85 Y86
Elongasyon faktör 1-alfa 1	P68104	EHALLA <u>Y</u> TLGVK	8	+	Y141
Elongasyon faktör 1-alfa 1	P68104	IGY <u>N</u> PDTVAFVPI <u>S</u> GWNGDNMoxLEPSANMoxPWFK	8	-	Y183
Elongasyon faktör 2	P13639	<u>Y</u> FDPANGK	26	+	Y265
Elongasyon faktör 1-gama Izoform 2	P26641-2	ILGLLDAYLK	100	+	Y145
Pütatif Elongasyon faktör 1-alfa-benzeri 3	Q5VTE0	CVESFSD <u>Y</u> PPPLGR	8	Nd	Y418
Endoplazmin	P14625	DISTN <u>Y</u> YASQK	228	+	Y678
Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	P04406-1	LISW <u>Y</u> DN <u>E</u> FG <u>Y</u> SNR	12	+	Y314 Y320
GTP-bağlı nükleer protein RAN	P62826	NLQ <u>Y</u> YDISAK	31	+	Y146 Y147
Is1 şok 70 kDa protein 1A/1B	P08107	TTP <u>S</u> YVAFTDTER	3	+	Y41
Is1 şok 70 kDa protein 1A/1B	P08107	IINEPTAA <u>A</u> IA <u>Y</u> GLDR	3	+	Y183
Is1 şok 70 kDa protein 1A	P0DMV8	EIAEA <u>Y</u> LGYPVTNAVITVPA <u>Y</u> FNDSQR	Nd	-	Y134
Is1 şok 70 kDa protein 1A	P0DMV8	ELEQV CamNPIISGL <u>Y</u> QGAGGPGGGFGAQGPK	Nd	+	Y611
Is1 şok 70 kDa protein 1A	P0DMV8	SINPDEAVA <u>Y</u> GAAVQAAILMoxGDK	Nd	+	Y371
Is1 şok 70 kDa protein 1A	P0DMV8	AF <u>Y</u> PEEISSMVLTK	Nd	-	Y115

Tablo 4.18. (Devam) CPO (1 mM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler^a

Protein	Erişim #	Peptit dizisi ^b	Sıra ^c	Fosforilasyon yeri ^d	
				+/-	aa ^e
Isı şok protein HSP 90 beta	P08238	FYEAFSK	10	-	Y430
Isı şok protein HSP 90 beta	P08238	YESLTDPSK	10	+	Y56
Isı şok protein HSP 90 beta	P08238	NPDDITQEEYGEFYK	10	+	Y301 Y305
Isı şok protein HSP 90 beta	P08238	SIYYITGESK	10	+	Y484
60 kDa Isı şok protein, mitokondriyal	P10809	CamEFQDA Y VLLSEK	69	+	Y243
Isı şok protein HSP 90-alfa izoform 2	P07900-2	DNSTMoxGYMoxAAK	58	+	Y627
Heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1	P22626	DYFEEYGK	15	+	Y131
Heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1	P22626	GGSDGYGSGR	15	-	Y234
Heterojen nükleer ribonükleoprotein C1/C2	P07910	GFAFVQYVNER	Nd	+	Y57
Heterojen nükleer ribonükleoprotein H2	P55795	THYDPPR	784	-	Y195
Heterojen nükleer ribonükleoprotein K	P61978	AYEPQGGGYDYSYAGGR	47	+	Y361
Heterojen nükleer ribonükleoprotein K izoform 2	P61978-2	TDYNASVSVDPDSSGPER	47	+	Y72
Heterojen nükleer ribonükleoprotein L	P14866	YGGGSEGGR	95	+	Y47 Y48
Heterojen nükleer ribonükleoprotein U	Q00839	GYFEYIEENK	117	+	Y257
Heterojen nükleer ribonükleoprotein U	Q00839	EKPYFPIPEEYTFIQNVPLEDR	117	+	Y466 Y473
Heterojen nükleer ribonükleoprotein U	Q00839	YNILGTNTIMoxDK	117	+	Y525
Histon H4	P62805	ISGLIYEETR	1	+	Y51
Histon H4	P62805	DAVTYTEHAK	1	+	Y72
Histon H4	P62805	TVTAMDVVYALK	1	+	Y88

Tablo 4.18. (Devam) CPO (1 mM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler^a

Protein	Erişim #	Peptit dizisi ^b	Sıra ^c	Fosforilasyon yeri ^d	
				+/-	aa ^e
Histon H4	P62805	TVTAMDVV Y ALK	1	+	Y88
Histon H4	P62805	TLYGFGG	1	+	Y98
Histon H1.4	P10412	ALAAA G YDVEK	840	+	Y71
Histon H2B type 1L	Q99880	KES S VVYK	6478	+	Y38
Histon H1x	Q92522	Y SQLVVETIR	656	-	Y48
Histon H1.3	P16402	ALAAA G YDVEK	4517	+	Y72
L-laktat dehidrogenaz A zincir	P00338	DQLI Y NLLK	62	+	Y10
L-laktat dehidrogenaz A zincir	P00338	QVVES A YEVK	62	+	Y239
L-laktat dehidrogenaz B zincir	P07195	MVVES A YEVK	20	+	Y240
NADH dehidrogenaz [ubikinin] 1 alfa altkompleks altünit 11 izoform 2	Q86Y39	EKPDDPL N YFLGGCamAGGLTLGAR	789	-	Y90
Peroksiredoksin-1	Q06830	TIAQ D YGVLK	9	+	Y116
Peroksiredoksin -2	P32119	LSE D YGVLK	50	+	Y115
Fosfogliserat kinaz 1	P00558	LGDV V VNDAFGTAHR	102	+	Y161
Fosfogliserat kinaz 1	P00558	Y AEAVTR	102	-	Y324
Fosfogliserat kinaz 1	P00558	Y SLEPVAVELK	102	+	Y76
Protein NipSnap homolog 3A	Q9UFN0	S Y L KPSK	3155	-	Y42 Y43
Pürüvat kinaz PKM	P14618	G D YPLEAVR	42	+	Y370
Pürüvat kinaz PKM	P14618	CamDENIL W LD Y K	42	+	Y161
Pürüvat kinaz PKM	P14618	I YVDDGLISLQ V K	42	+	Y175
Pürüvat kinaz PKM	P14618	EAEAA I YHLQLFEELR	42	+	Y390

Tablo 4.18. (Devam) CPO (1 mM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler^a

Protein	Erişim #	Peptit sekans ^b	Sıra ^c	Fosforilasyon yeri ^d	
				+/-	aa ^e
Pürüvat kinaz PKM	P14618	LNFSHGTHE <u>Y</u> HAE <u>T</u> IK	42	+	Y83
Ras-ilişkili protein Rab-1A	P62820	<u>Y</u> ASENVNK	1990	+	Y112
40S Ribozomal protein S6	P62753	NKEEA <u>AEY</u> AK	114	+	Y209
40S Ribozomal protein S2	P15880	SPYQEF <u>D</u> H <u>L</u> VK	67	+	Y266
40S Ribozomal protein S3a	P61247	ACamQSI <u>Y</u> PLHDVFVR	59	-	Y215
40S Ribozomal protein S9	P46781	LIGE <u>Y</u> GLR	87	+	Y35
40S Ribozomal protein S10	P46783	D <u>Y</u> LHLPPEIVPATLR	215	+	Y82
40S Ribozomal protein S10	P46783	IAI <u>Y</u> ELLFK	215	+	Y12
40S Ribozomal protein S13	P62277	GLAPDL <u>P</u> ED <u>L</u> YHLIK	97	+	Y89
40S Ribozomal protein S19	P39019	ELAP <u>Y</u> DENW <u>F</u> Y <u>T</u> R	214	+	Y48 Y54
60S Ribozomal protein L3	P39023	IGQ <u>Y</u> L <u>I</u> K	46	+	Y291
60S Ribozomal protein L5	P46777	NSVTPDMoxMoxEEMox <u>Y</u> K	60	+	Y240
60S Ribozomal protein L6	Q02878	Y <u>Y</u> PTEDVPR	39	-	Y115
60S Ribozomal protein L7	P18124	IVE <u>P</u> YIAWGYPNLK	38	+	Y139
60S Asidik ribozomal protein P0	P05388	IIQLDD <u>Y</u> PK	135	+	Y24
60S Ribozomal protein L13a	P40429	<u>Y</u> QAVTATLEEK	145	+	Y149
60S Ribozomal protein L23a	P62750	L <u>Y</u> DIDVAK	27	+	Y117
60S Ribozomal protein L27	P61353	<u>Y</u> SVDIPLDK	32	-	Y85
60S Ribozomal protein L29	P47914	L <u>AY</u> IAHPK	163	+	Y98
60S Ribozomal protein L36	Q9Y3U8	EVCamGFAP <u>Y</u> ER	82	-	Y53
60S Ribozomal protein L17 izoform 3	P18621-3	<u>Y</u> SLDPENPTK	164	+	Y4

Tablo 4.18. (Devam) CPO (1 mM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizati içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler^a

Protein	Erişim #	Peptit dizisi ^b	Sıra ^c	Fosforilasyon yeri ^d	
				+/-	aa ^e
Splicing faktör, (prolin ve glutaminden zengin)	P23246-1	NLSPYVSNELLEAAFSQFGPIER	263	+	Y381
Splicing faktör, (prolin ve glutaminden zengin)	P23246-1	YGEPEGEVFINK	263	+	Y320
Stress-70 protein, mitokondriyal	P38646	RYDDPEVQK	199	+	Y128
T- kompleks protein 1 altünite beta	Q99832	LPIGDVATQYFADR	221	+	Y302
T- kompleks protein 1 altünite epsilon	P48643	IADGYEQAAAR	127	-	Y137
Threonin-tRNA ligaz izoform 2, sitoplazmik	P26639-2	WELNSGDGAFYGPVK	381	-	Y540
Transgelin-2 izoform 2	P37802-2	DGTVLcamELINALYPEGQAPVK	202	-	Y70
Transmembran emp24 domain-içeren protein 2	Q15363	HEQEYMOxEVR	570	+	Y150
Tübülün alfa-1B zincir	P68363	IHFPLATYAPVISAEK	Nd	+	Y272
Tübülün alfa-1B zincir	P68363	FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR	Nd	+	Y262
Tübülün alfa-1B zincir	P68363	EDAANNYAR	Nd	+	Y103
Tübülün beta-3 zincir	Q13509	GHYTEGAELVDSVLDVVR	2533	+	Y106
Tübülün beta zincir	P07437	YLTVA AVFR	121	+	Y310
Tübülün beta zincir	P07437	NSSYFVVEWIPNNVK	121	+	Y340
Tübülün beta zincir	P07437	LTTPTIYGDLNHLVSATMoxSGVTTCamLR	121	+	Y222
Tübülün beta zincir	P07437	ISVYYNEATGGK	121	+	Y50
X-ray repair cross-complementing protein 6	P12956	NIPPYFVALVPQEEELDDQK	165	-	Y409
14-3-3 protein epsilon	P62258	YLAEFATGNDR	29	+	Y131
14-3-3 protein epsilon	P62258	AAFDDAIAELDTLSEESYK	29	+	Y214

^a Veriler Triple-TOF ve Orbitrap kütle spektrometreleri ile elde edildi. ^b Modifiye amino asit kalın ve altı çizili olarak gösterildi. ^c Proteinler, iBAQ değerleri (140) kullanılarak ve mümkün olduğunda MaxQB veritabanında (141) doğrulanmış bulunma bolluğuna göre sıralanmaktadır. HEK 293 proteomu için iBAQ tablosunda bulunan proteinlerden en çok bulunan ilk sırada ve en az bollukta bulunan protein 6858. sırada yer almaktadır (140). iBAQ skorlaması genellikle birden fazla UniProt sayısını tek bir değerde birleştirir. Bu bazen birden fazla proteine verilen sırayla sonuçlanmaktadır. 'Nd', UniProt numarası için iBAQ tablosunda giriş olmadığını göstermektedir. ^d Bu çalışmada tanımlanan dietoksisfosforile tirozinlerin aynı zamanda *in vivo* fosforilasyon alanları olup olmadığını kontrol etmek için 'Phospho Site' (<http://www.phosphosite.org/homeAction.action>) kullanıldı. Fosforilasyonun meydana gelip gelmediğini gösteren, +/- sütunudur. ^e amino asit sekansında hangi tirozinin modifiye olduğunu göstermektedir. 'Nd,' proteinin fosforilasyon durumu hakkında hiçbir veri olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.19. CPO (10 µM ve 250 µM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler.

Protein	Erişim #	Peptit dizisi	DepY ^a		DepY ^a	
			10 µM CPO	250 µM CPO	10 µM CPO	250 µM CPO
Alfa- enolaz	P06733	AGYTDKVVIGMDVAAASEFFR	-	-	-	3
Alfa- enolaz	P06733	AAVPSGASTGIYEALRL	-	1	-	-
Alfa- enolaz	P06733	IGAEVYHNLK	-	4	-	-
Elongasyon faktör 2	P13639	YFDPANGK	-	4	-	-
Heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1	P22626	DYFEEYGK	-	-	-	-
Histon H4	P62805	ISGLIYEETR	2	8	-	-
Histon H4	P62805	DAVTYTEHAK	-	2	-	-
Isı şok 70 kDa protein 1A/1B	P08107	TTPSYVAFDTER	-	2	-	-
Isı şok 70 kDa protein 1A/1B	P08107	IINEPTAAAIAYGLDR	-	1	-	-
Isı şok 70 kDa protein 1A/1B	P08107	IINEPTAAAIAYGLDR	-	1	-	-
Isı şok protein HSP 90 beta	P08238	FYEAFSK	-	4	-	-
Kofilin-1	P23528	HELQANCYEEVK	-	-	-	-
L-laktat dehidrogenaz B zincir	P07195	MVVESAYEVIK	-	-	-	-
Tübülün alfa-1B zincir	P68363	IHFPLATYAPVISAEK	-	4	-	-

Tablo 4.19. (Devam) CPO (10 μ M ve 250 μ M) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde tirozinden modifiye olan peptitler/proteinler

Protein	Erişim #	Peptit dizisi ^b	DepY ^a		10 μ M CPO	250 μ M CPO
			10 μ M CPO	250 μ M CPO		
60S ribozomal protein L6	Q02878	YYPTEDVPR	-	-	-	-
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	DSYVGDEAQSK	-	1	-	-
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	GYSFTTTAER	-	1	-	8
Aktin, sitoplazmik 2	P63261	QEYDESGPSIVHR	-	1	-	-
Endoplazmin	P14625	DISTNYIASQK	-	-	-	-
Fosfogliserat kinaz 1	P00558	LGDVYVNDAFGTAHR	-	1	-	-
Fosfogliserat kinaz 1	P00558	YAEAVTR	-	1	-	-
Heterojen nükleer ribonükleoprotein U	Q00839	GYFEYIEENK	-	4	-	-
Histon H1.4	P10412	ALAAAGYDVEK	1	5	-	1
Histon H2B tip 1L	Q99880	KESYSVYVYK	-	-	-	-
Isı şok protein HSP 90-alfa	P07900	FYEQFSK	-	1	-	-
L-laktat dehidrogenaz A zincir	P00338	DQLIYNLLK	-	1	-	-
Pürüvat kinaz PKM	P14618	GDYPLEAVR	-	1	-	-

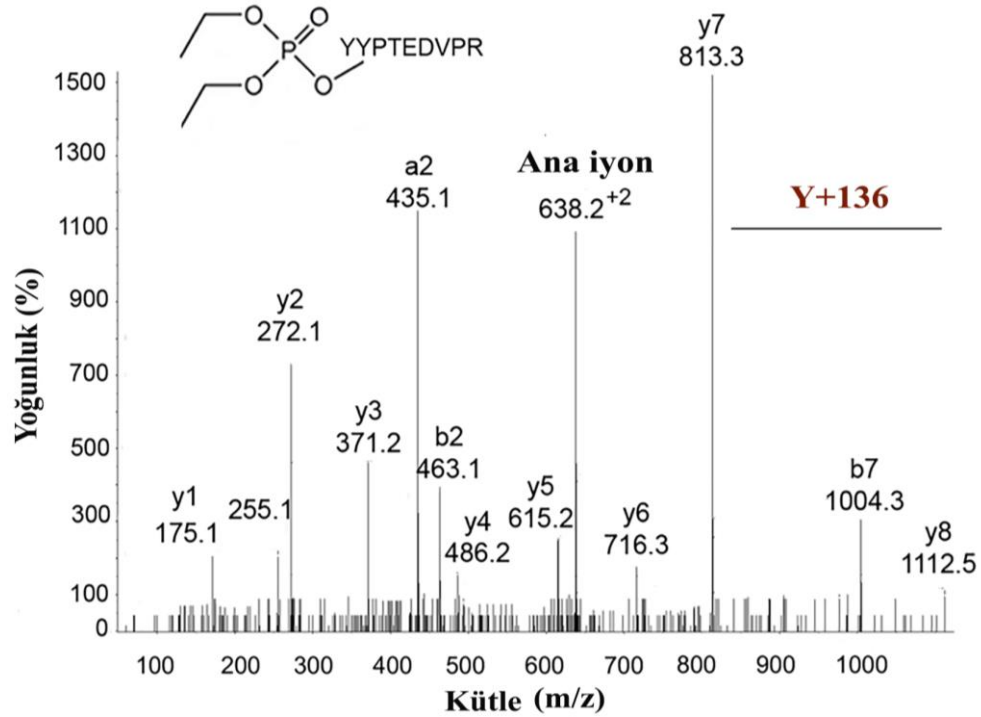
^aHücre lizatı triptik peptitlerinin depY ile saflaştırıldığını ifade etmektedir. ^b Modifiye amino asit kalın ve altı çizili olarak gösterildi. (-) peptit sekansının gözlenmediğini ifade etmektedir. Tabloda sunulan sayılar, Protein Pilot ile yapılan analizde (Triple TOF 6600 LC-MS/MS) gösterilen modifiye peptit sekanslarının sayısıdır.

Tablo 4.20. CPO (10 µM, 250 µM ve 1000 µM) ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatı içerisinde lizinden ve serinden modifiye olan peptitler/proteinler.

Protein	Erişim #	Peptit dizisi ^b	DepY ^a 10 µM CPO	DepY ^a 250 µM CPO	DepY ^a 1000 µM CPO	10 µM CPO	250 µM CPO	1000 µM CPO
Histon H4	P62805	TVTAMDVVYAL <u>K</u>	-	-	-	-	1	-
Nükleolin	P19338	IGMTR <u>K</u> FGYVDFESAEDLEK ^b	-	-	-	5	-	-
Gamma-enolaz	P09104	IAQLAGN <u>S</u> DLILPVPAFNVINGGSHAGNK	-	-	-	-	1	-
Histon H3.2	Q71DI3	YQ <u>K</u> STELLIR	-	-	-	-	3	6

^aHücre lizatı triptik peptitlerinin dep Y ile saflaştırıldığını ifade etmektedir. ^b Modifiye amino asit kalın ve altı çizili olarak gösterildi. (-) Peptit dizisinin gözlenmediğini ifade etmektedir. Tabloda sunulan sayılar, Protein Pilot ile yapılan analizde (Triple TOF 6600 LC-MS/MS) gösterilen modifiye peptit dizilerinin sayısıdır.

Çalışmada Triple TOF analizleri sonucunda elde edilen tüm peptitlerin dizileri ve işaretli amino asitlerin konumları, manuel dizileme ve PeakView v 2.1 (Ab Sciex, Framingham, MA) yazılımı kullanılarak doğrulandı. Şekil 4.21’de, 60S ribozomal protein L6’ya ait dietoksifosfotirozin modifiye YYPTEDVPR peptidi için MS/MS fragmentasyon spektrumu gösterilmektedir. +2 yüklü ana iyon (638.2 Da), dietoksifosfat modifikasyonu ile (+136 Da) ile uyumlu bir kütleyle sahiptir. YYPTEDVPR peptidi içerisinde iki tirozin bulunmaktadır. Modifikasyon ikinci tirozin üzerinde gerçekleşmiştir, bu durum y8 iyonunun 1112.5 Da kütleyle sahip olması ile doğrulanmıştır. Eğer eklenti N-terminalindeki tirozin üzerinde olsaydı, y8 iyonu 976.4 Da’lık bir kütleyle sahip olurdu. Tüm bu hesaplamalar Proteomics Toolkit (<http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>) yardımı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.21. 60S ribozomal protein L6 proteinine (Q02878) ait dietoksifosfat ile modifiye YYPTEDVPR peptidin MS/MS spektrumu. Dietoksifosfat eklentisi (+136 Da) peptit dizisindeki ikinci tirozin üzerindedir. y7 ile y8 iyon arasındaki kütle farkı 299 Da olup, tirozin (163 Da) ve dietoksifosfatın (+136 Da) varlığı ile uyumludur.

5. TARTIŞMA

5.1. Hedef Olarak Dietoksifosfotirozinin Seçilme Nedeni

Bu doktora tez çalışması kapsamında, herhangi bir proteindeki tirozin amino asidi üzerinde oluşan OP pestisit kaynaklı dietoksifosfat eklenti ürünlerini, tirozin etrafındaki amino asit dizisinden bağımsız olarak tanıyan bir monoklonal antikor, ilk kez üretilmiş ve depY olarak isimlendirilen bu antikorun detaylı olarak karakterizasyonu ELISA, Western Blot ve kütle spektrometri yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda OP pestisitlerle zehirlenen insanlardan alınan plazma örnekleri analiz edildiğinde; albümindeki Tyr411 üzerinden eklenti ürünlerinin oluştuğu gösterilmiştir (6, 112).

Bu tez çalışmasında sadece albüminin değil, aynı zamanda diğer proteinlerin de tirozin üzerinden OP bileşikler ile modifiye edildiği ve bu proteinlerin düşük miktarda bulunmaları nedeniyle; kimlikleri tanımlanmadan önce zenginleştirilmeleri gerektiği hipotezlendi. Bununla birlikte, dietoksifosfat eklentisi ile modifiye olduğu varsayılan proteinlerin, hücre büyümesi ve farklılaşması sırasında doğal olarak fosforilasyon/defosforilasyona uğrayan proteinler olabileceği (143, 144) ve bu proteinlerin, OP bileşikler tarafından geri dönüşümsüz olarak modifiye edildiğinde fonksiyonlarının bozulacağı düşünüldü. Bu proteinler üzerindeki dietoksifosfat eklenti ürünlerini tanıyacak bir monoklonal antikorun (depY), tirozin üzerinden modifiye edilen proteinlerin tanımlanmasında yardımcı olacağı öngörüldü.

Monoklonal antikorun üretilmesi için diğer iyi bir aday ise, dietoksifosfolizindir. Çünkü CPO ile muamele edilen proteinlerin hemen hemen hepsinde lizin amino asidi modifiye olmaktadır. V-tipi sinir gazlarının, ubikitinin biyolojik işlevinden sorumlu altı lizin amino asidi fosfonilatladığı gösterilmiştir (145). Ayrıca lizin aminoasidinin asetilasyonu ve metilasyonu, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan tersinir posttranslasyonel modifikasyonlardır (146, 147). Lizin amino asidi, OP bileşikler tarafından geri dönüşümsüz olarak modifiye edilirse gen ifadesinin düzenlenmesinin bozulacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla dietoksifosfotirozin ve dietoksifosfoserine (134) ek olarak dietoksifosfolizini tanıyan bir antikor, OP maruziyeti ile oluşan kronik hastalıkların mekanizmasını anlamak için yararlı olacaktır.

5.2. Literatürde OP Eklenti Ürünlerini Taniyan Antikorlar

OP pestisit maruziyeti, AChE ve BChE'nin aktif bölgesinde bulunan serin amino asidinin geri dönüşümsüz modifikasyonu ile birlikte enzim aktivite kaybına ve toksisiteye neden olmaktadır. CPO ve paraokson gibi yaygın olarak kullanılan pestisitler, serin amino asidi üzerinde dietoksifosfat eklenti ürünü oluşturmaktadır. Daha önce pek çok kez çeşitli laboratuvarlarda, modifiye edilen AChE'yi modifiye edilmemiş AChE'den, ayırmak için antikor üretimi denenmiştir. Böyle bir antikoru üretmenin en büyük zorluğu, *O*-fosforile olan serinin *in vivo* olarak kararsız olmasıdır (134, 148). Dolayısı ile fosforile serin, dehidroalanine dönüştüğü için hayvanlarda antikor üretilememiştir. Bu sorun, daha sonra Charles Thompson ve ark. tarafından serindeki yan zincir OH grubunu CH₂ grubu ile yer değiştirilerek çözülmüştür (134). Bu substitüsyon reaksiyonu fosforile serinin, OP ligandının kaybı ile β-eliminasyon reaksiyonuna girmesini engellemiş ve böylece, di- ve mono-etoksifosfat modifiye serini tanıyan monoklonal antikor üretimi gerçekleştirilmiştir.

Albümündeki Tyr411 üzerinde pinokolil metil fosfonat (soman) ve VX eklenti ürünlerini tanıyan monoklonal antikorlar da üretilmiştir (149) ve kompetitif ELISA yöntemi ile bu monoklonal antikorların bağlama afinitelerinin nanomolar düzeyde olduğu bulunmuştur. Ayrıca birkaç laboratuvar, soman'ı nötralize etmek amacıyla, soman haptene karşı monoklonal antikorlar üretmiştir. Ancak üretilen monoklonal antikor, somanın *in vivo* konsantrasyonunu, toksik olmayan seviyelere indirmek için yeterli afiniteye sahip olmadığı için çok fazla bir başarı elde edilememiştir. (150-152).

5.3. Aktif Bölgesinde Serin İçermeyen Proteinlerde Tirozin ve Lizin

Amino Asitleri, Serine Göre Daha Reaktiftir

Saf proteinler ile yapılan çalışmalar, tirozin ve lizin amino asitlerinin, OP bileşikler tarafından serin ve treonine göre daha kolay bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir (10, 18). Bununla birlikte, serin hidrolazlar (AChE, BChE ve karboksilesteraz) istisna bir enzim ailesidir çünkü enzimlerin aktif bölgesinde bulunan serin, katalitik triad içindeki amino asitlerle etkileşime girmesi nedeniyle çok düşük bir pK_a değerine sahiptir (125). Aktif bölgesinde serin amino asidi içermeyen proteinler ise, sinir ajanları ve OP pestisitleri ile tirozin ve lizin amino asitlerinden çok daha kolay bir şekilde modifiye olmaktadır (9, 145, 153-155). Çalışmanın

gerçekleştirildiği HEK 293 hücrelerinde, endojen AChE, BChE ve karboksilesteraz bulunmamaktadır. Bu da kütle spektrometri analizlerinde serin amino asidi üzerinde CPO kaynaklı dietoksifosfat modifikasyonunun neden gözlenmediği durumuna açıklık getirmektedir.

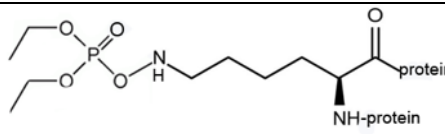
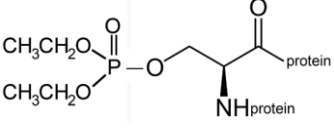
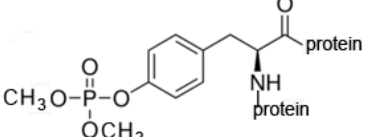
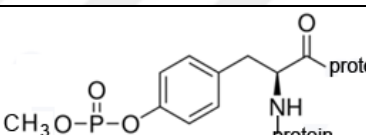
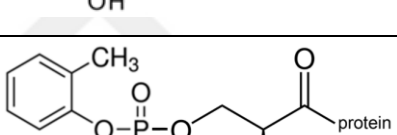
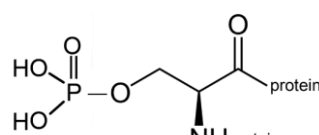
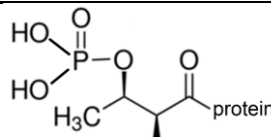
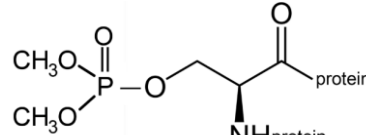
5.4. DepY Monoklonal Antikor Seçiciliği

ELISA, Western blot ve kütle spektrometri sonuçları, CPO ile muamele sonrasında depY monoklonal antikorun, hem saf peptit/saf protein eklenti ürünleri ile hem de HEK 293 hücre lizatlarındaki protein eklenti ürünleri ile seçici olarak reaksiyona girdiğini göstermektedir.

İmmobilize depY ile immünopürifikasyon sonrasında, kütle spektrometrisi ile tanımlanan dietoksifosfotirozin peptitlerin sayısı 7.7 kat artarken, modifiye olmamış peptitlerin sayısı ise 70 kat azalmaktadır.

CPO ile gerçekleşen dietoksifosfat modifikasyonu, serin amino asidine ek olarak tirozin (125) ve lizin (18) amino asitleri üzerinde de gerçekleşmektedir. Ancak depY monoklonal antikor ile HEK 293 hücre lizatlarına ait triptik peptitlerin immünopürifikasyonu sonrasında gerçekleştirilen kütle spektrometri ile sadece dietoksifosfotirozin peptitler tanımlanırken dietoksifosfolizin ve dietoksifosfoserin modifiye peptitler gözlenmemiştir. Bu sonuç, dietoksifosfotirozin modifiye saf proteinler ve peptitler üzerinde yapılan çalışma sonuçları ile de uyumludur (156). Monoklonal depY, amino asit dizisinden bağımsız olarak sadece dietoksifosforile-tirozine bağlanmaktadır. Ayrıca depY antikorunu, farklı amino asitler üzerinde oluşan dietoksifosfat modifikasyonunu ve diğer OP bileşikler ile oluşan farklı eklenti ürünlerini tanımlamaktadır (Tablo 5.1.). Bu durum, depY monoklonal antikorun, *Caenorhabditis elegans* dahil herhangi bir hayvanda dietoksifosfotirozin modifiye proteinleri tanımlamada kullanabileceğini göstermektedir (157).

Tablo 5.1. DepY monoklonal antikorun bağlanmadığı haptener.

Hapten	Kimyasal yapı
Dietoksifosfolizin protein	
Dietoksifosferin protein	
Dimetoksifosfotirozin protein	
Monometoksifosfotirozin protein	
O-krezilfosferin protein	
Fosferin protein	
Fosfotreonin protein	
Dimetoksifosferin protein	

5.5. DepY Monoklonal Antikor için Afinité

Çalışmada, çok sayıda tirozin amino asidi üzerinden dietoksifosforillenmiş tübülün ve diğer proteinlerin, depY'e yüksek afinite ($K_d:10^{-12}$ M) ile bağlandığı

gösterildi. Ancak tek bir tirozin üzerinden modifiye edilen peptitlerin, daha düşük afinite ile depY'e bağlandığı bulundu ($K_d : 10^{-8}$ M).

Dietoksifosforillenmiş tirozinleri tanıyan daha yüksek afiniteli bir monoklonal antikorun üretimi, farenin yerine tavşanın kullanılması veya tek bir B hücresinin klonlanması ile gerçekleştirilebilir (158).

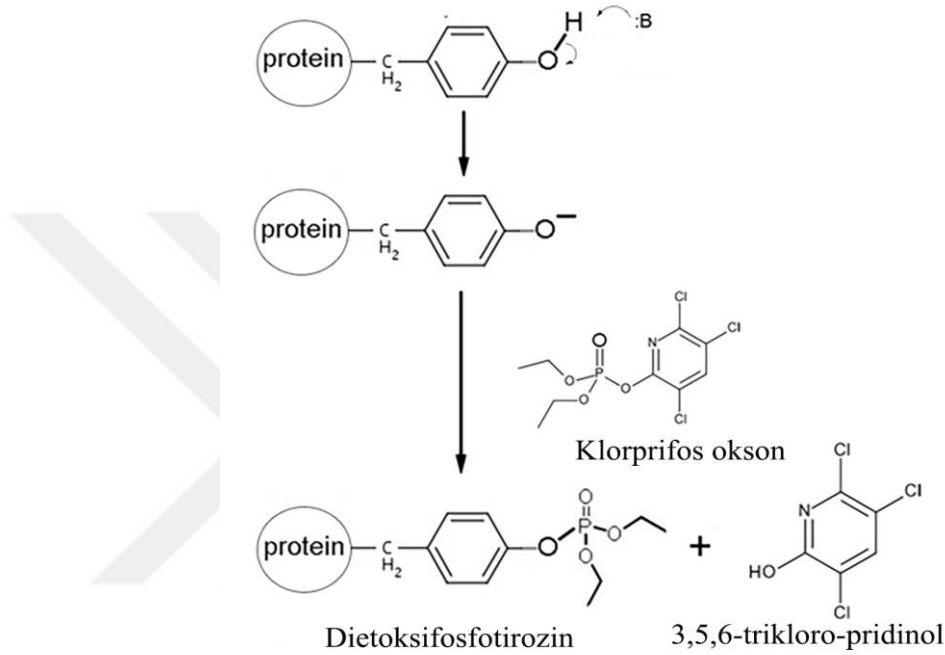
5.6. CPO ile Tirozin üzerinden Kovalent Olarak Modifiye Edilen Proteinler

CPO (1000 μ M) ile muamele edilen HEK 293 hücre lizatlarına ait triptik peptitlerinin depY ile immünopürifiye edilmesi sonrasında 73 farklı protein üzerinde 116 dietoksifotirozin modifiye peptit tanımlandı (Bkz. Tablo 4.18). Daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak tirozin üzerinde yaşlanma reaksiyon ürünü olan monoetoksifosfat eklenti ürünleri saptanmadı (8-10, 159).

Çalışma sonunda, HEK 293 hücre lizatlarında modifiye edilen proteinlerin çoğunun HEK 293 proteomunun % 3'ünü oluşturduğu ve bolluk sıralamasına göre incelendiğinde; bu proteinlerin HEK 293 hücrelerinde bulunma sıralamasının ilk 200'den az olduğu gözlemlendi [6858 x 0.03]. Beklendiği gibi, modifikasyonun sık gözlemlendiği proteinler, en yüksek total peptit sayısına sahip olup, HEK 293 proteomundaki en bol bulunan proteinler arasında yer almaktaydı: Histon H4, ısı şok 70 kDa protein 1A/1B, ısı şok proteini HSP 90 beta ve alfa enolaz. Ayrıca bu genelleme ile ilgili istisnai olarak; HEK 293 proteomunun 1390. sırasında (% 20) bulunan Calpain küçük alt birimi 1, 1710. sırasında (% 25) bulunan Aktin sitoplazmik 2, 2533. sırasında (% 37) bulunan Tübülün beta-3, 3155. sırasında (% 46) bulunan protein NipSnap homolog 3A, 4517. sırasında (% 66) bulunan Histon H173, ve 6478. sırasında (% 94) bulunan Histon H2B tip 1L de CPO ile modifiye oldu.

HEK 293 hücre lizati, 10 μ M CPO ile muamele edildiğinde, sadece Histon H4 ve Histon H1.4 proteine ait dietoksifotirozin modifiye peptitler tanımlandı. Histon H4, HEK 293 proteomunda en bol bulunan proteindir bu da onun yüksek reaktivitesini açıklamaktadır. Histon H1.4 ise daha az bulunmaktadır ve sonuçlar, histon H1.4'deki bir tirozinin özellikle daha reaktif olduğunu göstermektedir. İnsan albümininde bulunan Tyr411'in benzer bir reaktivitesi, onun pozitif yüklü amino asidin yakınındaki bir cepte bulunması ile açıklanmaktadır (7, 160). Bu konumdaki tirozinde bulunan O-

4-fenolik hidroksil grubunun, kısmen deproton olmasi ile negatif yüklü amino asidin, CPO ile reaksiyona girerek TCP'nin ayrilmasini kolaylastirdigi ve aynı zamanda dietoksifosfat ile kovalent bir bağ olusturduğu düşünölmektedir (Şekil 5.1.) Bui-Nguyen ve ark. tarafından yapılan bir çalışma sonucunda, pozitif yüklü arjininler veya lizinlerin (18) çevresindeki tirozinlerin spesifisitesi bildirilmiştir (153).



Şekil 5.1. Klorprifos okson ve tirozin arasında gerçekteşen tepkime. Yüksek reaktivitenin gözlenmesi, iyonize olmuş fenolik hidroksil grubunu stabilize eden pozitif yüklü bir amino asidin varlığı ile açıklanmaktadır. Negatif yüklü tirozin yan zincirinin, CPO'daki fosfor atomuna saldırması sonucunda TCP salınmakta ve tirozin üzerinde dietoksifosfat esteri oluşmaktadır.

5.7. Fizyolojik İlişki

Çalışmada HEK 293 hücre lizatlarının CPO ile muamele edilmesi sonrasında kütle spektrometri ile modifiye olan proteinler tanımlandı. Bu sonuçlardan bağımsız olarak, HEK 293 hücreleri çalışmada kullanılan aynı CPO konsantrasyonları ile muamele edildiğinde; kullanılan dozların hücre canlılığını görsel olarak etkilemediği

bulundu. Ancak bu CPO konsantrasyonlarının, insanlarda AChE aktivitesini önemli ölçüde inhibe ederek ölüme neden olacağı düşünülmektedir. Örneğin CPF ile intihar girişiminde bulunan bir bireyin hastaneye yatış anından 5 saat sonra alınan kan örneğinde, 12 μM CPF gözlenmiştir. Aynı bireyden 4 gün boyunca alınan kan örneğinde 48 saat sonra plazma CPO konsantrasyonu 0.1 μM 'a ulaşmıştır (32). Başka bir çalışmada ise, alımından 16 saat sonra plazmadaki serbest CPO konsantrasyonunun 0.175 μM olduğu gözlenmiştir (113). Bu çalışmalar, insanların 0.175 μM CPO konsantrasyonlarında yaşayabileceğini, ancak çok daha yüksek CPO konsantrasyonlarında hayatta kalmasının mümkün olmadığını göstermektedir.

Toksik olmayan bir CPF dozun hayvanlarda protein eklenti ürünleri oluşturup oluşturmadığını incelemek için yapılan bir çalışmada, farelere 14 gün boyunca günlük 3 mg/kg CPF uygulanmıştır. Günlük 3 mg/kg CPF doz uygulamasıyla farelerin beyinlerinde, beta-tübülün üzerinde dietoksifosfat eklentileri bulunmuştur (122), ancak bu doz uygulaması, farelerde toksik etkilere ve kandaki AChE'nin önemli derecede inhibisyonuna neden olmamıştır. Atomik kuvvet mikroskobu ile görüntülediğinde; dietoksifosfotirozin modifiye tübülünün, mikrotübüllerin yapısal modifikasyonları ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte dietoksifosfotirozin modifiye tübülünü tanımlamak için tübülün saflaştırılmıştır.

Benzer koşullar altında CPO ile muamele edilen farelerden alınan dokularda, proteinlerin tek başına saflaştırılması yerine, depY monoklonal antikorun kullanımı ile, dietoksifosfotirozin içeren proteinlerin zenginleştirilmesi mümkün olacaktır. Böylece kimliği bilinmeyen proteinlerin tirozin üzerindeki eklenti ürünlerinin tanımlanması sağlanacaktır.

5.8. Fosfo-tirozin Bölgeleri ile Reaksiyon

Çalışmanın bu aşamasında CPO ile muamele sonrasında oluşan dietoksifosfotirozinlerin konumlarının, biyolojik olarak ilişkili olup olmadığı sorgulandı. Hücre lizis işlemi kullanılan RIPA tamponu içerisindeki deterjanların, CPO ile muamele öncesinde çözünür proteinleri denatüre ettiği bilinmektedir. Bu nedenle, dietoksifosfotirozin bölgelerinin aynı zamanda doğal olarak bulunan bir fosforilasyon bölgesi olup olmadığını incelemek için, fosforilasyon dahil olmak üzere proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları hakkında kapsamlı bilgi sağlayan ve

sistem biyolojisi kaynağı olan Phospho Site veri tabanından yararlanıldı (<http://www.phosphosite.org/homeAction.action>). Sonuçlar, tanımlanan 116 adet CPO-modifiye tirozinin 96'sının fosforilasyon bölgesinde konumlandığını ve bu bölgelerin de biyolojik açıdan ilişkili olduğunu gösterdi (Bkz. Tablo 4.18.).

Proteinlerde kinazlar aracılığı ile tirozin amino asidinin fosforilasyonunun fizyolojik olarak önemli olduğu bilinmektedir (161). Tirozinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu, saniyeler içinde bir hücrenin ihtiyacına cevap veren dinamik bir olaydır (161). Tirozin amino asidi CPO ile dietoksifosforile olduğunda, oluşan eklenti ürünü stabildir. Dolayısı ile tirozinlerin CPO ile geri dönüşümsüz modifikasyonunun, homeostazı bozacağı ve hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir.

5.9. Diğer OP Çalışması ile Karşılaştırma

Bui-Nguyen ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kompleks bir karışımdaki organofosforlanmış peptitler ilk kez tanımlanmıştır (153). Bu çalışmalarında Bui-Nguyen ve ark. insan hepatosit benzeri hücre (HepaRG) lizatlarını işaretlemek için diklorvos kullanmıştır. Hücre lizatları 50, 500 ve 5000 μM diklorvos ile muamele edildikten sonra, örnekler herhangi bir saflaştırılma işlemine tabi tutulmadan doğrudan OrbiTrap Velos kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Verilerin, Proteome Discoverer-Sequest veritabanı arama algoritmasıyla analizi sonucunda 29 farklı proteine ait 34 farklı dimetoksifosfat modifiye-peptit tanımlanmıştır. Çalışmalarında, 4 adet dimetoksifosfat modifiye serin, 4 adet dimetoksifosfat modifiye treonin ve 26 dimetoksifosfotirozin peptit tanımlanmıştır. (153).

Bu doktora tez çalışmasında, hücre lizatlarının depY ile saflaştırılmadan kütle spektrometre ile analizi sonucunda 12 farklı proteine ait 15 dietoksifosfotirozin içeren peptit tespit edildi. Ayrıca, dietoksifosfo-serin ve dietoksifosfotreonin modifikasyonları gözlenmedi ve 3 adet dietoksifosfolizin modifikasyonu içeren peptit saptandı. Bui-Nguyen ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, dimetoksifosfo-lizin modifikasyonu tanımlanmamıştır (153). DepY ile immünopürifiye edilen örneklerin kütle spektrometri sonuçları Bui-Nguyen ve ark.'nın elde ettiği sonuçlar ile karşılaştırıldığında; sadece 9 proteine ait 14 peptit eşleşmektedir. İki ayrı çalışmaya ilişkin deneysel protokoldeki birçok değişken, çalışma sonucundan elde edilen

farklılıkları açıklayabilmektedir. Her iki çalışma sonucunda da, OP bileşiklerin çeşitli proteinler üzerindeki tirozini kovalent olarak modifiye ettiği bulunmuştur.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez kapsamında üretilen monoklonal antikor depY'nin, dietoksifosfotirozin modifiye peptit/proteinleri, amino asit dizisinden bağımsız olarak tanıdığı gösterildi. Dietoksifosfotirozine spesifik depY antikoruna, diğer OP bileşikler tarafından oluşan farklı eklenti ürünlerini ve diğer amino asitler üzerinde oluşan eklenti ürünlerini tanımadı. Ayrıca, depY'nin, CPO ile muamele edilmiş HEK 293 hücre lizatında dietoksifosfotirozin içeren proteinleri de spesifik olarak tanıdığı ve bağladığı bulundu. Kütle spektrometri analizleri sonucunda 73 farklı proteine ait 116 dietoksifosfotirozin modifiye peptit tanımlandı.

Sonuç olarak, depY antikoruna, OP maruziyeti ile meydana gelen kronik hastalıkların mekanizmasının aydınlatılmasında, modifiye proteinlerin ve biyobelirteçlerin tanımlanmasında ve ayrıca farklı protein eklenti ürünlerini tanımak amacıyla kullanılacak yeni antikorların tasarımında yararlı olacaktır.

İleride depY monoklonal antikor kullanılarak *in vivo* çalışmalar ile dietoksifosfotirozin modifiye proteinlerin kimliğinin belirlenmesi ve ayrıca dietoksifosfolizin eklenti ürünlerini tanıyacak bir antikor tasarımının gerçekleştirilmesi planlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Pope C, Karanth S, Liu J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005;19(3):433-46.
2. Mileson BE, Chambers JE, Chen W, Dettbarn W, Ehrich M, Eldefrawi AT, et al. Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. *Toxicological Sciences*. 1998;41(1):8-20.
3. Beseler CL, Stallones L, Hoppin JA, Alavanja MC, Blair A, Keefe T, et al. Depression and pesticide exposures among private pesticide applicators enrolled in the Agricultural Health Study. *Environmental health perspectives*. 2008;116(12):1713.
4. Salvi RM, Lara DR, Ghisolfi ES, Portela LV, Dias RD, Souza DO. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicological Sciences*. 2003;72(2):267-71.
5. Richards PG, Johnson MK, Ray DE. Identification of acylpeptide hydrolase as a sensitive site for reaction with organophosphorus compounds and a potential target for cognitive enhancing drugs. *Molecular Pharmacology*. 2000;58(3):577-83.
6. Van der Schans MJ, Hulst AG, van der Riet-van Oeveren D, Noort D, Benschop HP, Dishovsky C. New tools in diagnosis and biomonitoring of intoxications with organophosphorothioates: case studies with chlorpyrifos and diazinon. *Chem Biol Interact*. 2013;203(1):96-102.
7. Schopfer LM, Grigoryan H, Li B, Nachon F, Masson P, Lockridge O. Mass spectral characterization of organophosphate-labeled, tyrosine-containing peptides: characteristic mass fragments and a new binding motif for organophosphates. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(17-18):1297-311.
8. Williams NH, Harrison JM, Read RW, Black RM. Phosphylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents. *Archives of toxicology*. 2007;81(9):627-39.
9. John H, Breyer F, Thumfart JO, Höchstetter H, Thiermann H. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detection and identification of albumin phosphorylation by organophosphorus pesticides and G-and V-type nerve agents. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010;398(6):2677-91.
10. Lockridge O, Schopfer LM. Review of tyrosine and lysine as new motifs for organophosphate binding to proteins that have no active site serine. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1-3):344-8.
11. Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*. 2006;366(1-2):1-13.
12. Mangas I, Vilanova E, Estévez J, França TCC. Neurotoxic Effects Associated with Current Uses of Organophosphorus Compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2016.

13. Hargreaves AJ. Neurodegenerations Induced by Organophosphorous Compounds. In: Ahmad SI, editor. Neurodegenerative Diseases. New York, NY: Springer US; 2012. p. 189-204.
14. Kazuhito Yokoyama SA, Katsuyuki Murata, Mariko Nishikitani, Tetsu Okumura, Shinichi Ishimatsu, Nobukatsu Takasu. Chronic neurobehavioral and central and autonomic nervous system effects of Tokyo subway sarin poisoning. *J Physiology* 1998;92:317-23.
15. Koelle GB. GA. Anticholinesterase drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1949;95 Pt. 2:166-216.
16. Sanger F, editor Amino-acid sequences in the active centers of certain enzymes. *Proc Chem Soc*; 1963.
17. Peeples ES, Schopfer LM, Duysen EG, Spaulding R, Voelker T, Thompson CM, et al. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. *Toxicol Sci.* 2005;83(2):303-12.
18. Grigoryan H, Li B, Xue W, Grigoryan M, Schopfer LM, Lockridge O. Mass spectral characterization of organophosphate-labeled lysine in peptides. *Anal Biochem.* 2009;394(1):92-100.
19. Storm JE. Organophosphorus Pesticides. *Patty's Toxicology: John Wiley & Sons, Inc.*; 2001.
20. Hernandez AF, Gil F, Lacasana M. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Arch Toxicol.* 2017;91(10):3211-23.
21. GUPTA RC. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. Amsterdam ; London, Elsevier Academic Press. 2006.
22. Harun Alp AK, M.Murat, Çelik, S.Kağan Başarslan. Organofosfat Zehirlenmesinde Yeni Bir Tedavi Yaklaşımı:Fitoterapi. *Mustafa Kemal ÜnivTıp Derg.*, 2012;3(9):8-18.
23. Gavrilesco M, Demnerova K, Aamand J, Agathos S, Fava F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *N Biotechnol.* 2015;32(1):147-56.
24. EC EC. Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein. Commission staff working document. 2005.
25. Gonzalez-Alzaga B, Lacasana M, Aguilar-Garduno C, Rodriguez-Barranco M, Ballester F, Rebagliato M, et al. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):104-21.
26. Parron T, Requena M, Hernandez AF, Alarcon R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;256(3):379-85.
27. Parron T, Requena M, Hernandez AF, Alarcon R. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):157-65.

28. Gunnell D, Eddleston M, Phillips MR, Konradsen F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health*. 2007;7:357.
29. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity. *Visnyk of Lviv University Biology series*. 2010;54:3-14.
30. Testai E, Buratti FM, Di Consiglio E. Chapter 70 - Chlorpyrifos A2 - Krieger, Robert. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*. New York: Academic Press; 2010. p. 1505-26.
31. Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical reviews in toxicology*. 2008;38 Suppl 2:1-125.
32. Eyer F, Roberts DM, Buckley NA, Eddleston M, Thiermann H, Worek F, et al. Extreme variability in the formation of chlorpyrifos oxon (CPO) in patients poisoned by chlorpyrifos (CPF). *Biochemical pharmacology*. 2009;78(5):531-7.
33. Roinestad KS, Louis JB, Rosen JD. Determination of pesticides in indoor air and dust. *Journal of AOAC International*. 1993;76(5):1121-6.
34. Munoz-Quezada MT, Iglesias V, Lucero B, Steenland K, Barr DB, Levy K, et al. Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. *Environment international*. 2012;47:28-36.
35. Wang RG, Knaak JB, Maibach HI. *Health Risk Assessment Dermal and Inhalation Exposure and Absorption of Toxicants*: CRC Press; 2017.
36. Organization WH. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces: report of the WHO informal consultation, Geneva, 28-30 September 1998. 1998.
37. Organization WH. *Organophosphorus insecticides: a general introduction*. 1986.
38. Timchalk C, Nolan RJ, Mendrala AL, Dittenber DA, Brzak KA, Mattsson JL. A Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans. *Toxicol Sci*. 2002;66(1):34-53.
39. Colosio C, Fustinoni S, Birindelli S, Bonomi I, De Paschale G, Mammone T, et al. Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers. *Toxicology letters*. 2002;134(1-3):133-40.
40. Lein PJ, Bonner MR, Farahat FM, Olson JR, Rohlman DS, Fenske RA, et al. Experimental strategy for translational studies of organophosphorus pesticide neurotoxicity based on real-world occupational exposures to chlorpyrifos. *Neurotoxicology*. 2012;33(4):660-8.
41. Crane AL, Klein K, Olson JR. Bioactivation of chlorpyrifos by CYP2B6 variants. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2012;42(12):1255-62.

42. Ellison CA, Smith JN, Lein PJ, Olson JR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorpyrifos in adult male Long-Evans rats following repeated subcutaneous exposure to chlorpyrifos. *Toxicology*. 2011;287(1-3):137-44.
43. Chambers JE, Chambers HW. Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 1989;4(3):201-3.
44. Lotti M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. Hayes' *Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*: Elsevier; 2010. p. 1543-89.
45. Atterberry TT, Burnett WT, Chambers JE. Age-related differences in parathion and chlorpyrifos toxicity in male rats: target and nontarget esterase sensitivity and cytochrome P450-mediated metabolism. *Toxicology and applied pharmacology*. 1997;147(2):411-8.
46. Needham LL. Assessing exposure to organophosphorus pesticides by biomonitoring in epidemiologic studies of birth outcomes. *Environmental health perspectives*. 2005;113(4):494.
47. Qiao D, Seidler FJ, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Environmental health perspectives*. 2003;111(4):536.
48. Buratti F, Leoni C, Testai E. The human metabolism of organophosphorothionate pesticides: consequences for toxicological risk assessment. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2007;2(1):37-44.
49. Yang X, Wu X, Brown KA, Le T, Stice SL, Bartlett MG. Determination of chlorpyrifos and its metabolites in cells and culture media by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2017;1063:112-7.
50. Crane AL, Klein K, Zanger UM, Olson JR. Effect of CYP2B6*6 and CYP2C19*2 genotype on chlorpyrifos metabolism. *Toxicology*. 2012;293(1):115-22.
51. Croom EL, Wallace AD, Hodgson E. Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology*. 2010;276(3):184-91.
52. Costa LG, Giordano G, Cole TB, Marsillach J, Furlong CE. Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxicology*. 2013;307:115-22.
53. Campbell C, Seidler F, Slotkin T. Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions. *Brain research bulletin*. 1997;43(2):179-89.
54. Steevens JA, Benson WH. Toxicological interactions of chlorpyrifos and methyl mercury in the amphipod, *Hyalella azteca*. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 1999;52(2):168-77.

55. M Tata A, Velluto L, D'Angelo C, Reale M. Cholinergic system dysfunction and neurodegenerative diseases: cause or effect? *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2014;13(7):1294-303.
56. Casida JE, Quistad GB. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical research in toxicology*. 2004;17(8):983-98.
57. Flaskos J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: a direct role for the oxon metabolites. *Toxicology Letters*. 2012;209(1):86-93.
58. Richardson RJ. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: a critical review of the literature. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*. 1995;44(2):135-65.
59. Bjørling-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*. 2008;7(1):50.
60. Karalliedde L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. *Anaesthesia*. 1999;54(11):1073-88.
61. Hayes WJ, Laws ER. *Handbook of pesticide toxicology. Handbook of pesticide toxicology: Academic Press; 1991.*
62. Abou-Donia MB, Lapadula DM. Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity: type I and type II. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1990;30(1):405-40.
63. Sogorb MA, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology letters*. 2002;128(1-3):215-28.
64. Da Silva Gonçalves A, França TCC, Caetano MS, Ramalho TC. Reactivation steps by 2-PAM of tabun-inhibited human acetylcholinesterase: reducing the computational cost in hybrid QM/MM methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2014;32(2):301-7.
65. Barril J, Estévez J, Escudero M, Céspedes M, Níguez N, Sogorb M, et al. Peripheral nerve soluble esterases are spontaneously reactivated after inhibition by paraoxon: implications for a new definition of neuropathy target esterase. *Chemico-biological interactions*. 1999;119:541-50.
66. Gonçalves AdS, França TC, Figueroa-Villar JD, Pascutti PG. Molecular dynamics simulations and QM/MM studies of the reactivation by 2-PAM of tabun inhibited human acetylcholinesterase. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011;22(1):155-65.
67. Abou-Donia MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 2003;58(8):484-97.
68. Elerseck T, Filipic M. Organophosphorous pesticides-mechanisms of their toxicity. *Pesticides-The Impacts of Pesticides Exposure: InTech; 2011.*

69. Clegg DJ, Van Gemert M. Expert panel report of human studies on chlorpyrifos and/or other organophosphate exposures. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 1999;2(3):257-79.
70. Lotti M, Moretto A. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicological reviews*. 2005;24(1):37-49.
71. Thiermann H, Szinicz L, Eyer F, Worek F, Eyer P, Felgenhauer N, et al. Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning. *Toxicology letters*. 1999;107(1-3):233-9.
72. Rainier S, Bui M, Mark E, Thomas D, Tokarz D, Ming L, et al. Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease. *The American Journal of Human Genetics*. 2008;82(3):780-5.
73. Glynn P. A mechanism for organophosphate-induced delayed neuropathy. *Toxicology letters*. 2006;162(1):94-7.
74. Eto M, Casida JE, Eto T. Hydroxylation and cyclization reactions involved in the metabolism of tri-o-cresyl phosphate. *Biochemical pharmacology*. 1962;11(4-5):337-52.
75. Richardson RJ, Hein ND, Wijeyesakere SJ, Fink JK, Makhaeva GF. Neuropathy target esterase (NTE): overview and future. *Chemico-biological interactions*. 2013;203(1):238-44.
76. Morgan JP, Penovich P. Jamaica ginger paralysis: Forty-seven-year follow-up. *Archives of neurology*. 1978;35(8):530-2.
77. Carletti E, Schopfer LM, Colletier J-P, Froment M-Trs, Nachon F, Weik M, et al. Reaction of cresyl saligenin phosphate, the organophosphorus agent implicated in aerotoxic syndrome, with human cholinesterases: mechanistic studies employing kinetics, mass spectrometry, and X-ray structure analysis. *Chemical research in toxicology*. 2011;24(6):797-808.
78. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(2):549-57.
79. Bartels CF, Xie W, Miller-Lindholm AK, Schopfer LM, Lockridge O. Determination of the DNA sequences of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from cat and demonstration of the existence of both in cat plasma. *Biochemical pharmacology*. 2000;60(4):479-87.
80. Duysen EG, Li B, Xie W, Schopfer LM, Anderson RS, Broomfield CA, et al. Evidence for nonacetylcholinesterase targets of organophosphorus nerve agent: supersensitivity of acetylcholinesterase knockout mouse to VX lethality. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;299(2):528-35.
81. Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, et al. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;293(3):896-902.

82. Fidler A, Hulst AG, Noort D, De Ruiter R, Van der Schans M, Benschop H, et al. Retrospective detection of exposure to organophosphorus anti-cholinesterases: mass spectrometric analysis of phosphorylated human butyrylcholinesterase. *Chemical research in toxicology*. 2002;15(4):582-90.
83. Li B, Ricordel I, Schopfer LM, Baud F, Mégarbane B, Masson P, et al. Dichlorvos, chlorpyrifos oxon and Aldicarb adducts of butyrylcholinesterase, detected by mass spectrometry in human plasma following deliberate overdose. *Journal of Applied Toxicology*. 2010;30(6):559-65.
84. Lockridge O, Schopfer LM, Masson P. Biomarkers of exposure to organophosphorus poisons: a new motif for covalent binding to tyrosine in proteins that have no active site serine. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)*: Elsevier; 2015. p. 953-65.
85. Tholey A, Reed J, Lehmann WD. Electrospray tandem mass spectrometric studies of phosphopeptides and phosphopeptide analogues. *Journal of mass spectrometry*. 1999;34(2):117-23.
86. Casida JE, Quistad GB. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-biological interactions*. 2005;157:277-83.
87. Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, et al. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical pharmacology*. 2005;70(11):1673-84.
88. Lockridge O. Noncholinesterase Protein Targets of Organophosphorus Pesticides. *Advances in Molecular Toxicology* 2013. p. 179-205.
89. Srivastava A, Gupta B, Bihari V, Mathur N, Srivastava L, Pangtey B, et al. Clinical, biochemical and neurobehavioural studies of workers engaged in the manufacture of quinalphos. *Food and chemical toxicology*. 2000;38(1):65-9.
90. Song X, Seidler F, Saleh J, Zhang J, Padilla S, Slotkin T. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicology and applied pharmacology*. 1997;145(1):158-74.
91. Medina-Cleghorn D, Heslin A, Morris PJ, Mulvihill MM, Nomura DK. Multidimensional profiling platforms reveal metabolic dysregulation caused by organophosphorus pesticides. *ACS chemical biology*. 2013;9(2):423-32.
92. Schuh RA, Lein PJ, Beckles RA, Jett DA. Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicology and applied pharmacology*. 2002;182(2):176-85.
93. Slotkin TA, Seidler FJ, Fumagalli F. Exposure to organophosphates reduces the expression of neurotrophic factors in neonatal rat brain regions: similarities and differences in the effects of chlorpyrifos and diazinon on the fibroblast growth factor superfamily. *Environmental health perspectives*. 2007;115(6):909.
94. Slotkin TA, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of low dose diazinon exposure of neonatal rats: effects on serotonin systems in adolescence and adulthood. *Brain research bulletin*. 2008;75(5):640-7.

95. Moser VC. Comparisons of the acute effects of cholinesterase inhibitors using a neurobehavioral screening battery in rats. *Neurotoxicology and teratology*. 1995;17(6):617-25.
96. Pope C, Chakraborti T, Chapman M, Farrar J. Long-term neurochemical and behavioral effects induced by acute chlorpyrifos treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1992;42(2):251-6.
97. Pope CN. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 1999;2(2):161-81.
98. Eddleston M, Eyer P, Worek F, Mohamed F, Senarathna L, von Meyer L, et al. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. *The Lancet*. 2005;366(9495):1452-9.
99. Organization WH. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. 2010.
100. Fujikawa Y, Satoh T, Sukanuma A, Suzuki S, Niikura Y, Yui S, et al. Extremely sensitive biomarker of acute organophosphorus insecticide exposure. *Human & experimental toxicology*. 2005;24(6):333-6.
101. Satoh T, Inayat-Hussain SH, Kamijima M, Ueyama J. Novel biomarkers of organophosphate exposure. *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology*. 2011:289-302.
102. Scaloni A, Jones WM, Barra D, Pospischil M, Sassa S, Popowicz A, et al. Acylpeptide hydrolase: inhibitors and some active site residues of the human enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(6):3811-8.
103. Quistad GB, Klintonberg R, Casida JE. Blood acylpeptide hydrolase activity is a sensitive marker for exposure to some organophosphate toxicants. *Toxicological Sciences*. 2005;86(2):291-9.
104. Palmieri G, Bergamo P, Luini A, Ruvo M, Gogliettino M, Langella E, et al. Acylpeptide hydrolase inhibition as targeted strategy to induce proteasomal down-regulation. *PloS one*. 2011;6(10):e25888.
105. Fujino T, Watanabe K, Beppu M, Kikugawa K, Yasuda H. Identification of oxidized protein hydrolase of human erythrocytes as acylpeptide hydrolase 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000;1478(1):102-12.
106. Kim JH, Stevens RC, MacCoss MJ, Goodlett DR, Scherl A, Richter RJ, et al. Identification and characterization of biomarkers of organophosphorus exposures in humans. *Paraoxonases in Inflammation, Infection, and Toxicology*: Springer; 2010. p. 61-71.
107. Marsillach J, Richter RJ, Kim JH, Stevens RC, MacCoss MJ, Tomazela D, et al. Biomarkers of organophosphorus (OP) exposures in humans. *Neurotoxicology*. 2011;32(5):656-60.
108. Huff RA, Corcoran JJ, Anderson JK, Abou-Donia MB. Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits cAMP accumulation in rat striatum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1994;269(1):329-35.

109. Bomser JA, Casida JE. Diethylphosphorylation of rat cardiac M2 muscarinic receptor by chlorpyrifos oxon in vitro. *Toxicology letters*. 2001;119(1):21-6.
110. Lein PJ, Fryer AD. Organophosphorus insecticides induce airway hyperreactivity by decreasing neuronal M2 muscarinic receptor function independent of acetylcholinesterase inhibition. *Toxicological sciences*. 2004;83(1):166-76.
111. Li B, Schopfer LM, Hinrichs SH, Masson P, Lockridge O. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry assay for organophosphorus toxicants bound to human albumin at Tyr411. *Analytical biochemistry*. 2007;361(2):263-72.
112. Li B, Ricordel I, Schopfer LM, Baud F, Megarbane B, Nachon F, et al. Detection of adduct on tyrosine 411 of albumin in humans poisoned by dichlorvos. *Toxicol Sci*. 2010;116(1):23-31.
113. Li B, Eyer P, Eddleston M, Jiang W, Schopfer LM, Lockridge O. Protein tyrosine adduct in humans self-poisoned by chlorpyrifos. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;269(3):215-25.
114. Toomey R, Alpern R, Vasterling JJ, Baker DG, Reda DJ, Lyons MJ, et al. Neuropsychological functioning of US Gulf War veterans 10 years after the war. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 2009;15(5):717-29.
115. Kamel F, Engel L, Gladen B, Hoppin J, Alavanja MC, Sandler D. Neurologic symptoms in licensed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Human & experimental toxicology*. 2007;26(3):243-50.
116. Hancock DB, Martin ER, Mayhew GM, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, et al. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC neurology*. 2008;8(1):6.
117. Howard AS, Bucelli R, Jett DA, Bruun D, Yang D, Lein PJ. Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;207(2):112-24.
118. Terry AV, Stone J, Buccafusco J, Sickles D, Sood A, Prendergast M. Repeated exposures to subthreshold doses of chlorpyrifos in rats: hippocampal damage, impaired axonal transport, and deficits in spatial learning. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003;305(1):375-84.
119. Terry AV, Gearhart DA, Beck WD, Truan JN, Middlemore M-L, Williamson LN, et al. Chronic, intermittent exposure to chlorpyrifos in rats: protracted effects on axonal transport, neurotrophin receptors, cholinergic markers, and information processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;322(3):1117-28.
120. Grigoryan H, Schopfer LM, Peeples ES, Duysen EG, Grigoryan M, Thompson CM, et al. Mass spectrometry identifies multiple organophosphorylated sites on tubulin. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009;240(2):149-58.

121. Grigoryan H, Schopfer LM, Thompson CM, Terry AV, Masson P, Lockridge O. Mass spectrometry identifies covalent binding of soman, sarin, chlorpyrifos oxon, diisopropyl fluorophosphate, and FP-biotin to tyrosines on tubulin: a potential mechanism of long term toxicity by organophosphorus agents. *Chemico-biological interactions*. 2008;175(1-3):180-6.
122. Jiang W, Duysen EG, Lockridge O. Mice treated with a nontoxic dose of chlorpyrifos oxon have diethoxyphosphotyrosine labeled proteins in blood up to 4 days post exposure, detected by mass spectrometry. *Toxicology*. 2012;295(1-3):15-22.
123. Jiang W, Duysen EG, Hansen H, Shlyakhtenko L, Schopfer LM, Lockridge O. Mice treated with chlorpyrifos or chlorpyrifos oxon have organophosphorylated tubulin in the brain and disrupted microtubule structures, suggesting a role for tubulin in neurotoxicity associated with exposure to organophosphorus agents. *Toxicological Sciences*. 2010;115(1):183-93.
124. Li B, Nachon F, Froment M-T, Verdier L, Debouzy J-C, Brasme B, et al. Binding and hydrolysis of soman by human serum albumin. *Chemical research in toxicology*. 2007;21(2):421-31.
125. Li B, Schopfer LM, Grigoryan H, Thompson CM, Hinrichs SH, Masson P, et al. Tyrosines of human and mouse transferrin covalently labeled by organophosphorus agents: a new motif for binding to proteins that have no active site serine. *Toxicological sciences*. 2008;107(1):144-55.
126. Grigoryan H, Li B, Anderson EK, Xue W, Nachon F, Lockridge O, et al. Covalent binding of the organophosphorus agent FP-biotin to tyrosine in eight proteins that have no active site serine. *Chemico-biological interactions*. 2009;180(3):492-8.
127. Li B, Duysen EG, Froment M-T, Masson P, Nachon F, Jiang W, et al. Polyclonal antibody to soman-tyrosine. *Chemical research in toxicology*. 2013;26(4):584-92.
128. Means G, Wu H-L. The reactive tyrosine residue of human serum albumin: characterization of its reaction with diisopropylfluorophosphate. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1979;194(2):526-30.
129. Schopfer LM, Champion MM, Tamblyn N, Thompson CM, Lockridge O. Characteristic mass spectral fragments of the organophosphorus agent FP-biotin and FP-biotinylated peptides from trypsin and bovine albumin (Tyr410). *Analytical biochemistry*. 2005;345(1):122-32.
130. Read RW, Riches JR, Stevens JA, Stubbs SJ, Black RM. Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphorylated butyrylcholinesterase and phosphorylated albumin after oxime therapy. *Archives of toxicology*. 2010;84(1):25.
131. Chaiken IM, Smith EL. Reaction of a specific tyrosine residue of papain with diisopropylfluorophosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 1969;244(15):4247-50.

132. Johnson F, Lewis S, Shafer J. Perturbations in the Free Energy and Enthalpy of Ionization of Histidine-159 at the Active Site of Papain As Determined by Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry*. 1981;20(1):52-8.
133. Singh S, Sharma N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. *Neurology India*. 2000;48(4):308.
134. Belabassi Y, Chao C-K, Holly R, George KM, Nagy JO, Thompson CM. Preparation and characterization of diethoxy-and monoethoxy phosphylated ('aged') serine haptens and use in the production of monoclonal antibodies. *Chemico-biological interactions*. 2014;223:134-40.
135. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*. 1961;7(2):88-95.
136. Smith PK, Krohn RI, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
137. Onder S, Schopfer LM, Tacal O, Blake TA, Johnson RC, Lockridge O. Mass spectral detection of diethoxyphospho-tyrosine adducts on proteins from HEK293 cells using monoclonal antibody depY for enrichment. *Chemical research in toxicology*. 2018.
138. Schopfer LM, Furlong CE, Lockridge O. Development of diagnostics in the search for an explanation of aerotoxic syndrome. *Analytical biochemistry*. 2010;404(1):64-74.
139. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(42):41141-7.
140. Geiger T, Wehner A, Schaab C, Cox J, Mann M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(3):M111. 014050.
141. Schaab C, Geiger T, Stoehr G, Cox J, Mann M. Analysis of high accuracy, quantitative proteomics data in the MaxQB database. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(3):M111. 014068.
142. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011;473(7347):337.
143. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.
144. Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current opinion in cell biology*. 2009;21(2):140-6.
145. Schmidt C, Breyer F, Blum M-M, Thiermann H, Worek F, John H. V-type nerve agents phosphonylate ubiquitin at biologically relevant lysine residues and induce intramolecular cyclization by an isopeptide bond. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014;406(21):5171-85.

146. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009;325(5942):834-40.
147. Van Nuland R, Gozani O. Histone H4 lysine 20 (H4K20) methylation, expanding the signaling potential of the proteome one methyl moiety at a time. *Molecular & cellular proteomics*. 2016;15(3):755-64.
148. MacDonald M, Lanier M, Cashman J. Solid-phase synthesis of phosphonylated peptides. *Synlett*. 2010;2010(13):1951-4.
149. Chen S, Zhang J, Lumley L, Cashman JR. Immunodetection of serum albumin adducts as biomarkers for organophosphorus exposure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2013;344(2):531-41.
150. Jia P, Wang Y, Yu M, Wu J, Yang R, Zhao Y, et al. An organophosphorus hapten used in the preparation of monoclonal antibody and as an active immunization vaccine in the detoxication of soman poisoning. *Toxicology letters*. 2009;187(1):45-51.
151. Johnson JK, Cerasoli DM, Lenz DE. Role of immunogen design in induction of soman-specific monoclonal antibodies. *Immunology letters*. 2005;96(1):121-7.
152. Hunter KW, Lenz DE, Brimfield AA, Naylor JA. Quantification of the organophosphorus nerve agent soman by competitive inhibition enzyme immunoassay using monoclonal antibody. *FEBS letters*. 1982;149(1):147-51.
153. Bui-Nguyen TM, Dennis WE, Jackson DA, Stallings JD, Lewis JA. Detection of dichlorvos adducts in a hepatocyte cell line. *J Proteome Res*. 2014;13(8):3583-95.
154. Crow BS, Pantazides BG, Quiñones-González J, Garton JW, Carter MD, Perez JW, et al. Simultaneous measurement of tabun, sarin, soman, cyclosarin, VR, VX, and VM adducts to tyrosine in blood products by isotope dilution UHPLC-MS/MS. *Analytical chemistry*. 2014;86(20):10397-405.
155. Noort D, Hulst A, van Zuylen A, van Rijssel E, van der Schans M. Covalent binding of organophosphorothioates to albumin: a new perspective for OP-pesticide biomonitoring? *Archives of toxicology*. 2009;83(11):1031-6.
156. Onder S, Dafferner AJ, Schopfer LM, Xiao G, Yerramalla U, Tacal O, et al. Monoclonal Antibody That Recognizes Diethoxyphosphotyrosine-Modified Proteins and Peptides Independent of Surrounding Amino Acids. *Chemical research in toxicology*. 2017;30(12):2218-28.
157. Lewis JA, Szilagyi M, Gehman E, Dennis WE, Jackson DA. Distinct patterns of gene and protein expression elicited by organophosphorus pesticides in *Caenorhabditis elegans*. *BMC genomics*. 2009;10(1):202.
158. Kurosawa N, Wakata Y, Inobe T, Kitamura H, Yoshioka M, Matsuzawa S, et al. Novel method for the high-throughput production of phosphorylation site-specific monoclonal antibodies. *Scientific reports*. 2016;6:25174.
159. Black RM, Harrison JM, Read RW. The interaction of sarin and soman with plasma proteins: the identification of a novel phosphonylation site. *Archives of toxicology*. 1999;73(2):123-6.

160. Schopfer LM, Lockridge O. Analytical approaches for monitoring exposure to organophosphorus and carbamate agents through analysis of protein adducts. *Drug testing and analysis*. 2012;4(3-4):246-61.
161. Hunter T. The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(5):a020644.



8. ÖZGEÇMİŞ

BİREYSEL BİLGİLER

Ad Soyad: Seda ÖNDER

Doğum Yeri: Antalya

Doğum Tarihi: 30 Mayıs 1991

Uyruk: T.C.

İletişim Adresi: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Telefon: 0312 305 14 99

e-mail: sedaonder@hacettepe.edu.tr

EĞİTİM

(2014-) Doktora Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya ABD

(2009-2014) Lisans Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

(2010-) Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi

(2005-2009) Antalya Anadolu Lisesi, Antalya

(2002-2005) Faruk Tugayoğlu İlköğretim Okulu, Antalya

(1997-2002) Gazi Mustafa Kemal İlköğretim Okulu, Antalya

MESLEKİ DENEYİM

(2016-) Araştırma Görevlisi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı

(2016- 2017) Araştırma Görevlisi Nebraska Tıp Fakültesi, Eppley Enstitüsü, Omaha,
NE USA

BİLİMSEL FAALİYETLER

Uluslararası Yayınlar

1. Onder S, Schopfer LM, Tacal O, Blake TA, Johnson RC, Lockridge O. Mass Spectral Detection of Diethoxyphospho-tyrosine Adducts on Proteins from HEK 293 Cells Using Monoclonal Antibody DepY for Enrichment. *Chem. Res. Toxicol.* 2018, 31, 520–530 (ACS Editors' Choice Makalesi- Bu doktora tezinden üretilmiştir.)
2. Onder S, Dafferner AJ, Schopfer LM, Xiao G, Yerramalla U, Tacal O, Blake TA, Johnson RC, Lockridge O. Monoclonal Antibody That Recognizes Diethoxyphosphotyrosine-Modified Proteins and Peptides Independent of Surrounding Amino Acids. *Chem Res Toxicol.* 2017 Dec 18;30(12):2218-2228 (Bu doktora tezinden üretilmiştir.)
3. Onder S, Tacal O, Lockridge O. (2018). Delipidation of Plasma Has Minimal Effects on Human Butyrylcholinesterase. *Front Pharmacol.* 5;9:117.
4. Onder S, Schopfer LM, Cashman JR, Tacal O, Johnson RC, Blake TA, Lockridge O. Use of Hupresin To Capture Red Blood Cell Acetylcholinesterase for Detection of Soman Exposure. *Anal Chem.* 2018 Jan 2;90(1):974-979.
5. Onder S, David E, Tacal O, Schopfer LM, Lockridge O. Hupresin Retains Binding Capacity for Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase after Sanitation with Sodium Hydroxide. *Front Pharmacol.* 2017 Oct 10;8:713
6. Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, Tacal O. Effects of phenothiazine-structured compounds on APP processing in Alzheimer's disease cellular model. *Biochimie.* 2017 Jul;138:82-89.
7. Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, Tacal O. Toluidine blue O modifies hippocampal amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochime.* 2018 146:105-112.

Uluslararası Bildiriler

1. Onder S, Dafferner A, Schopfer LW, Blake TM, Johnson R, Tacal O, Lockridge O. Monoclonal antibodies that recognize diethoxyphosphate-tyrosine modified proteins. Society for Developmental Biology, p. 53, 2017.
2. Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, Tacal O., The effect of toluidine blue O on amyloid- β peptide levels in human neuroblastoma cells. 40th FEBS Congress. 4-9 Temmuz 2015 FEBS J. 282 (Suppl 1), p.177.
3. Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, Tacal O., The effect of thionine on amyloid- β peptide levels in PS70 cells. “12th International Meeting on Cholinesterases-Sixth International Conference on Paraoxonases”, Alicante, İspanya 27 Eylül-2 Kasım 2015, Poster Session S07P; 2015. p.126.
4. Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, Tacal O., The extracellular A β levels are reduced by the cholinesterase inhibitor toluidine blue O in an Alzheimer’s disease-like cellular model. 41th FEBS Congress, Kuşadası, Türkiye: The FEBS Journal; 2016. p. 321.
5. Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, Tacal O., Effect of toluidine blue O on Tau Pathology in an Alzheimer’s Disease animal model. “FEBS Advanced Lecture Course ALC17-012, Island of Spetses/Yunanistan: Poster No. 68; 2017. p. 117.
6. Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, Tacal O., Toluidine blue O, but not thionine, alters APP processing in 3xTg-AD mice. 42nd FEBS Congress, Jerusalem, İsrail: The FEBS Journal 284 (Suppl. 1) 2017. p. 242.

Ulusal Bildiriler

1. Enteral Beslenme Tüpünden Uyulanan İlaçlardaki Sorbitole Bağlı Gastointestinal Yan Etkiler ve Türkiye’de Bulunan Bazı Müztahtarların İçerisindeki Sorbitol Miktarları. KEPAN, 2015. Seda Önder, Kutay Demirkan, Aygin Ekincioglu-Bayraktar, Kezban Akçay, Meltem Halil, Osman Abbasoglu.

Kongreler

1. '2017 West Coast Regional Meeting of the Society for Developmental Biology' Yosemite, Amerika Birleşik Devletleri, 28-31 Mart 2017.
2. '9. Klinik Enteral ve Parenteral Nütrisyon Kongresi' Antalya, Türkiye 18-22 Mart 2015

Katıldığı Projeler

1. **TÜBİTAK, 2014 Proje No:107S183**
Proje Başlığı: Alzheimer hastalığının tedavisinde fenoksazin ve fenotiyazin yapılı bileşiklerin kullanımlarının değerlendirilmesi ve etki mekanizmalarının araştırılması
2. **HÜBAB, Hızlı Destek, 2015 Proje No: THD-2015-6825**
Proje Başlığı: Azur B'nin amiloid beta peptitler üzerindeki etkilerinin araştırılması
3. **HÜBAB, Kapsamlı Proje, 2017 Project No: TSA-2017-13929**
Proje Başlığı: İnsan pankreas kanseri hücre hattında fenotiyazin yapılı bileşiklerin amiloid prekürsör benzeri protein 2 üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve etki mekanizmalarının araştırılması

Burslar

1. (2014-) TÜBİTAK- Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı 2211 Yurt içi Doktora Bursiyerliği