

**PROTEİNLERİN ÇÖZELTİ VE GAZ FAZINDAKİ
KONFORMASYONLARININ TUZAKLI İYON
HAREKETLİLİĞİ-KÜTLE SPEKTROMETRİSİ
KULLANILARAK İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF SOLUTION AND GAS PHASE
CONFORMATIONS OF PROTEINS USING TRAPPED
ION MOBILITY-MASS SPECTROMETRY**

BUĞRA BALABAN

PROF. DR BEKİR SALİH

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

PROTEİNLERİN ÇÖZELTİ VE GAZ FAZINDAKİ KONFORMASYONLARININ TUZAKLI İYON HAREKETLİLİĞİ- KÜTLE SPEKTROMETRİSİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

Buğra BALABAN

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Mayıs 2022, 93 sayfa

Gaz fazındaki protein konformasyonunun çözelti fazındaki konformasyonu yansıtmayı yansıtmadığı hakkında literatürde birçok yöntemle açıklamalar yapılmaya çalışılmakta olup henüz bu konu tam anlamı ile açıklığa kavuşturulmuş durumda değildir. Literatürde bu alanda yapılan çalışmalarda çözelti fazındaki proteinin pH, sıcaklık, iyon şiddeti değişimi ve çözücü gibi parametrelerin değiştirilmesi sonucunda meydana gelen çözelti fazındaki protein konformasyon değişikliklerinin proteinin gaz fazındaki konformasyonunun değişimi üzerindeki etkileri incelenmektedir.

Bu tez kapsamında gaz fazındaki protein konformasyonunun, çözelti fazındaki protein konformasyonunu ne kadar yansıttığı açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Proteinlerin farklı çözelti koşullarına ek olarak polistren sülfonat polimeri ile etkileşimi sonucunda

çözeltide gerçekleşen değişimlerin gaz fazına yansıyor yansımadağı hakkında çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmada çözeltide meydana getirilen değişimlerin (metanol eklenmesi ile yapının denatüre olması, iyon kaynağı sıcaklığının değiştirilmesinin etkin çarpışma kesiti üzerine etkileri, pH değişimi ile yapının pI noktasına ilerledikçe kompakt konformerlerin görülmesi gibi) proteinin gaz fazındaki konformasyonel özelliklerine yansıdığı gözlenmiştir. Literatürde pH ve organik çözelti değişimlerinin model proteinlerin konformasyonları üzerindeki etkilerinin incelendiğı birçok çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasındaki analizlerin literatüre daha fazla katkıda bulunabileceğı düşünölen fizyolojik koşullarda yürütölməsi gerektiğı düşünölmüştür. Tez kapsamında özellikle ESI-MS analizlerinde fizyolojik koşullara yakın koşulların sağlanması amacıyla yaygın olarak kullanılmakta olan amonyum asetat tuzunun protein yapıları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu analizler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, proteinin amonyum asetat çözeltisi içerisinde sadece su içerisinde olmasına kıyasla daha kompakt bir konformasyona sahip olduğı sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda amonyum asetat derişimindeki değışikliğin polimer-protein etkileşimlerine de etki ettiğı görölmüştür.

Polimer-protein etkileşimleri sonucunda çözeltide oluşın kompleksler gaz fazında da görölmüş ve bu komplekslerin bazı yüklerde kompaktlaştığı hakkında bilgiler edinilmiştir. Protein ile etkileşen polimerin zincir uzunluğu arttıkça, protein yapısının kapandığı belirlenmiştir. Etkileşimlerin daha iyi açıklanabilmesi adına moleküler dinamik simölasyonlardan faydalanılmıştır. Söz konusu konformasyonel etkilerin gaz fazında mı yoksa çözelti fazında mı gerçekleştiğinin anlaşılabilmesi için simölasyonlar kaba tanecikli modelleme ile Martini3 alan kuvveti ve GROMACS programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Simölasyon sonuçlarına göre bu kompleksleşmenin büyük çoğunluğunun çözelti fazında gerçekleştiğı ve kompleksin gaz fazında korunduğı yönündedir.

Anahtar Kelimeler: Protein konformasyonları, Kütle Spektrometrisi, Tuzaklı İyon Hareketliliği Spektrometrisi, Kaba Tanecikli Modelleme, Moleküler Dinamik Simölasyonları, Polielektrolitler.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOLUTION AND GAS PHASE CONFORMATIONS OF PROTEINS USING TRAPPED ION MOBILITY-MASS SPECTROMETRY

Buğra BALABAN

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH

May 2022, 93 pages

The issue on protein conformation in the gas phase has not been fully clarified yet. The protein conformation in the gas phase may be affected by conformational changes in the solution phase, which occur due to the changes in the parameters such as pH, temperature, ionic strength concentrations, and the types of solvents in the solution phase.

This thesis has been tried to clarify how much of the protein conformation in the gas phase reflects the protein conformation in the solution phase. In addition to various solution conditions, studies have been carried out on whether the changes that occur in the solution result from the interaction of the proteins with the polystyrene sulfonate polyelectrolyte.

In this study, it was observed that the changes in the solution phase (the addition of methanol, change in the ion source temperature, and pH change) affect the conformational

properties of the protein in the gas phase. Many studies in the literature examine the effects of pH, the presence of organic solvent, and how they affect the conformation of model proteins. For this reason, it was thought that this thesis's analyses should be carried out under physiological conditions, which can contribute more to the literature. Within the scope of the thesis, the effects of ammonium acetate, which is widely used salt in ESI-MS analyses of proteins to provide nearly physiological conditions were investigated. It was concluded that the protein has more compact conformation in ammonium acetate solution than just in water. The change in ammonium acetate concentration also affects the polyelectrolyte-protein interactions.

The polyelectrolyte-protein complexes formed in the solution were also seen in the gas phase and the compaction of these complexes at some charge states were observed. The protein becomes more compact with the increase in the chain length of the polyelectrolyte. Molecular dynamics simulations were also performed to explain the polyelectrolyte-protein interactions. The simulations were carried out with GROMACS molecular dynamics program and Martini3 Force-Field with the coarse-grained model. According to the simulation results, most of this complexation occurs in the solution phase and the complex is preserved in the gas phase.

Keywords: Protein conformations, Mass Spectrometry, Trapped Ion Mobility Spectrometry, Coarse-grain Modeling, Molecular Dynamic Simulations, Polyelectrolytes.

TEŞEKKÜR

Danışmanım Sayın Prof. Dr. Bekir SALİH'e yüksek lisansım sırasında istediğim özgürlükte laboratuvarında çalışma olanağı tanıdığı için, kapsamlı yardımı ve rehberliğinden, her zaman tez konusunda olan biteni takip ederek bilim insanı olma yolumda büyük katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ATAKAY'a çalıştığım konuyu yüksek lisans tezi olarak öneren, hetürlü desteğini benden esirgmeden detaylı bir bakış açısıyla konuyu ele alarak değerlendirmesi, yönlendirmesi ve katkıları olmasaydı belkide çalışmanın bitmesi hiç mümkün olmayacaktı. Ne zaman yardıma ihtiyacım olsa kıymetli vaktinden bana ayırarak gece gündüz demeden yardım ettiği için ne kadar teşekkür etsem azdır.

Verdikleri fikirler sayesinde tez konuma farklı bakış açılarıyla yardım ettikleri ve tezin başarıya ulaşması konusunda desteklerinden dolayı Arş.Gör. Emre BİROL, Arş.Gör. Dr. Ülkü GÜLER, Buse VARLIOĞLU, Serhat ÖZTÜRK, İzzet AVCI ve adını sayamadığım diğer SAREGLAB üyelerine teşekkürler. Konu hakkındaki mekanistik yaklaşımlarından dolayı Arş.Gör. Emre BİROL'a ayrıca teşekkürler.

Jüri üyeleri Prof. Dr. Cengiz KAVAKLI, Doç. Dr. Murat TORUN, Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet KAYILI'ya tez savunmama katılarak değerli zamanlarını ayırdıkları için teşekkürler.

Çıktığım bu yolda çalışmalarına her zaman değer veren maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürler... Teorik hesaplamalarda bilgisayarlarını erişime açtığı için kardeşim Bahadır'a ayrıca minnettarım.

Buğra BALABAN

Mayıs 2022, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Proteinlerin Yapısı, Konformasyonu, Katlanmaları ve Fonksiyonunun Önemi	3
2.1.1. Protein Konformasyonları için Analiz Teknikleri.....	4
2.2. Protein-Polielektrolit Etkileşimleri	8
2.3. Kütle Spektrometrisi	9
2.3.1. Kütle Analizörleri.....	9
2.3.2. Dedektör	12
2.4. İyonlaştırma teknikleri ve Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)	12
2.5. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) Mekanizması	14
2.5.1. Fizyolojik ortam için kullanılan uçucu olmayan tuzların ESI üzerindeki olumsuz etkisi	15
2.5.2. Amonyum Asetat ve Amonyum bikarbonat ile hazırlanan uçucu tuzların kullanımı	16
2.5.3. Çözelti Fazından Gaz Fazına Geçiş	17
2.6. İyon Hareketliliği Spektrometrisi.....	19
2.6.1. Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Spektrometrisi	19
2.6.2. Etkin Çarpışma Kesiti	23
2.7. Martini+Gö-like CG modeli ve Martini3 FF.....	28

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Kullanılan Kimyasallar	30
3.2. İyon Hareketliliği - Kütle Spektrometrisi (IM – MS) Analizleri	31
3.3. Teorik Çalışmalar	32
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Proteinlerin farklı çözelti ortamlarındaki TIMS-TOF-MS analizleri	33
4.2. Proteinlerin farklı derişimlerdeki AAC çözeltilerinde hazırlanmalarına bağlı olarak multimer oluşumunda gözlenen değişimler	46
4.3. Polistren Sülfonat - Protein Etkileşimleri	49
4.3.1. Polistiren sülfonat-sitokrom c Etkileşimleri	51
4.3.2. Polistiren sülfonat-Lizozim Etkileşimleri.....	55
4.5 Teorik ve Deneysel CCS çalışmaları	62
4.6. Moleküler Dinamik Simülasyonu çalışmaları	65
4.6.1. Çözelti Fazı Simülasyonu	66
4.6.2. Çözeltiden Gaz Fazına Alınan Kompleksin Simülasyonu.....	68
4.6.3. Sadece Gaz Fazının Simülasyonu.....	70
5. SONUÇLAR.....	72
6. KAYNAKLAR	75
EKLER.....	87
EK 1. İyon Sıcaklığının Etkisi	87
EK 2. Sitokrom c deneysel ve teorik CCS çizelgesi.....	88
EK 3. Lizozim deneysel ve teorik CCS çizelgesi	90
EK 4. Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	92
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Proteinlerin birincil yapıdaki aminoasit dizilimlerinin katlanarak dördüncül yapıyı oluşturması [12].	3
Şekil 2.2. 1HRC pdb kodlu proteinin ve porfirin IX halkasından oluşan Fe^{2+} içeren HEC ligandının görüntüsü [26]. (Maestro [27] programı kullanılarak oluşturulmuştur.)	7
Şekil 2.3. 1AKI pdb kodlu proteinin görüntüsü [29]. (Maestro [27] programı kullanılarak oluşturulmuştur.)	7
Şekil 2.4. Kütle spektrometrisinin genel diyagramı.	9
Şekil 2.5. DC/RF voltajlarının belirli bir kombinasyonu sayesinde, yalnızca seçilen m/z değerine (kırmızı çizgi) sahip iyonlar dört kutuplu kütle analizöründen geçebilir. Diğer m/z değerleri kararsız yörüngelere sahiptir (mavi çizgi).	10
Şekil 2.6. TOF analizöründe liner mod ile refletron modun çalışma prensibi.	11
Şekil 2.7. ESI-MS sisteminin basitleştirilmiş gösterimi.	13
Şekil 2.8. Çözelti fazından gaz fazına geçişin kabaca resmedilmesi.	17
Şekil 2.9. İyon buharlaşma modeli (IEM), yüklü kalıntı modeli (CRM) ve Zincir fırlatma modeli. (CEM)	17
Şekil 2.10. TIMS sisteminde odaklayıcı halkalar sayesinde proteinlerin konformasyonlarına göre birbirlerinden ayırımı sonucunda kompakt yapının düşük, açık yapının yüksek CCS (Ω) değeri aldığı görünmektedir.	20
Şekil 2.11. Sitokrom c için iki boyutlu ısı haritası.	21
Şekil 2.12. Seçilen bölgelerin belirlenerek cytc 6+ yükü içerisine karışan 12+ yüklü dimerin CCS bölgesinin belirlenmesi soldan itibaren bölge adları 3, 4 ve 5 aşağıdaki kısımda ise MS spektrumları gösterilmiştir.	21
Şekil 2.13. Her bir bölgedeki ısı haritasına karşılık gelen kütle spektrumları.	22
Şekil 2.14. Belirlenen bölgelerin hareketlilik spektrumlarının çıkarılması.	22
Şekil 2.15. Lennard-Jones Potansiyel fonksiyonunun grafiği [102].	25
Şekil 2.16. IMOS programında TMLJ azot molekül hareketinin görsel bir kesiti.	26
Şekil 2.17. R_g hesaplamaları temelde atomların kütle merkezindeki konumlarına dayanır [104].	28

Şekil 2.18. Martini CG tekniğindeki modeller listelenmiştir [107]. Protein bağlarının yapılmadığı model A , Elastik ağ modeli B ve Martini Gō-modeli C	29
Şekil 4.1. Su çözeltisi içerisindeki lizozim proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.....	33
Şekil 4.2. 50mM AAc çözeltisi içerisindeki lizozim proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.....	34
Şekil 4.3. Su çözeltisi içerisindeki sitokrom c proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.....	35
Şekil 4.4. 10 mM AAc çözeltisi (pH=3.1) içerisindeki sitokrom c proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.	35
Şekil 4.5. Farklı çözelti ortamlarından asetik asitin sitokrom c proteinin yüklenmesine etkisi [123].	36
Şekil 4.6. 10 mM AAc çözeltisi (pH=6.7) içerisindeki sitokrom c proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.	37
Şekil 4.7. 10 mM AAc çözeltisi (pH=10.2) içerisindeki sitokrom c proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.	37
Şekil 4.8. Sitokrom c proteininin iyon kaynağı sıcaklığı 100 °C ve farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 6+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.	38
Şekil 4.9. 10 mM AAc çözeltisi içerisinde hazırlanan ve farklı pH koşullarındaki sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 8+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.	39
Şekil 4.10. 10 mM AAc çözeltisi içerisinde hazırlanan ve farklı çözelti pH koşullarındaki sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 7+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.	40
Şekil 4.11. 10 mM AAc çözeltisi içerisinde hazırlanan ve farklı çözelti pH koşullarındaki sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 6+ yüklü monomer ve 12+ yüklü dimer iyonlarına ait mobilogramları.....	41
Şekil 4.12. Farklı çözelti ortamlarında hazırlanan sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 6+ monomer ve 12+ yüklü dimer iyonlarına ait mobilogramları.....	42

Şekil 4.13. Sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS analizinden elde edilen 7+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.....	43
Şekil 4.14. Su içerisinde hazırlanan lizozim proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı yüklerdeki iyonlarına ait mobilogramları.....	44
Şekil 4.15. Su içerisinde hazırlanan cytC proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı yüklerdeki iyonlarına ait mobilogramları.....	45
Şekil 4.16. Suda ve farklı derişimlerdeki AAc çözeltisinde hazırlanan sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 11+ yüklü dimer iyonuna ait mobilogramları.	46
Şekil 4.17. Suda ve farklı derişimlerdeki AAc çözeltisinde hazırlanan sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 14+ yüklü trimer iyonuna ait mobilogramları.	47
Şekil 4.18. Suda ve farklı derişimlerdeki AAc çözeltisinde hazırlanan lizozim proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 13+ yüklü dimer iyonuna ait mobilogramları.	48
Şekil 4.19. Farklı derişimlerdeki AAc çözeltisinde hazırlanan lizozim proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 11+ yüklü dimer iyonuna ait mobilogramları.	49
Şekil 4.20. 50 mM AAc çözeltisindeki PSS polimerinin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin ESI-MS spektrumu.....	50
Şekil 4.21. Su içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 7+ yüklü sitokrom c-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.	51
Şekil 4.22. 10mM AAc içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 7+ yüklü cytC-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.....	52
Şekil 4.23. Su içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 8+ yüklü sitokrom c-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.	53
Şekil 4.24. Su içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 9+ yüklü sitokrom c-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramlar.	53

Şekil 4.25. 25mM AAc içerisindeki protein-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin sitokrom c 11+ yüklü dimerine farklı PSS monomerlerinin proteinle etkileşim mobilogramları.....	54
Şekil 4.26. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 7+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.	55
Şekil 4.27. 10 mM AAc içerisindeki protein-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 7+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.	56
Şekil 4.28. Farklı çözelti ortamında hazırlanan lizozimin, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 7+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.....	57
Şekil 4.29. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının , 3 kV kapiler voltaj değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 8+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.	58
Şekil 4.30. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 9+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.	59
Şekil 4.31. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 10+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.	60
Şekil 4.32. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 11+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.	60
Şekil 4.33. Su ve farklı derişimdeki AAc çözeltileri içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 8+ yüklü lizozim-PSS6 kompleks iyonuna ait mobilogramları.....	61
Şekil 4.34. Su ve farklı derişimdeki AAc çözeltileri içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 8+ yüklü cytC-PSS6 kompleks iyonuna ait mobilogramları.	62

Şekil 4.35. 100 °C iyon kaynağı sıcaklığında sitokrom c proteininin farklı çözeltilerdeki yük durumuna bağlı CCS grafiği. (Konformerler, E=Geniş ve C=kompakt olmak üzere grafik üzerinde belirtilmiştir.).....	63
Şekil 4.36. 150 °C iyon kaynağı sıcaklığında sitokrom c proteininin farklı çözeltilerdeki yük durumuna bağlı CCS grafiği. (Konformerler, E=Geniş ve C=kompakt olmak üzere grafik üzerinde belirtilmiştir.).....	63
Şekil 4.37. 100 °C iyon kaynağı sıcaklığında lizozim proteininin farklı çözeltilerdeki yük durumuna bağlı CCS grafiği. (Konformerler, E=Geniş ve C=kompakt olmak üzere grafikte belirtilmiştir.).....	64
Şekil 4.38. 150 °C iyon kaynağı sıcaklığında lizozim proteininin farklı çözeltilerdeki yük durumuna bağlı CCS grafiği. (Konformerler, E=Geniş ve C=kompakt olmak üzere grafikte belirtilmiştir.).....	65
Şekil 4.39. Su molekülleri gösterilmeyen sistemde PSS5 ve 1AKI VMD [129] programı kullanılarak resmedilmiş sistemin başlangıç görüntüsü.....	66
Şekil 4.40. 100ns sonundaki PSS5-protein kompleksinin görüntüsü.....	66
Şekil 4.41. Proteinin (turuncu) ve Protein-PSS5 kompleksinin (mavi) çözeltide 100ns sonucundaki Rg değerleri.....	67
Şekil 4.42. Proteinin (turuncu) ve Protein-PSS3-4-5 (gri-sarı-mavi) komplekslerinin vakumda 100ns sonucundaki Rg değerleri.....	68
Şekil 4.43. Çözelti fazından vakum ortama alınan lizozim molekülü 12+ yüklenerek yanına PSS5 molekülü konulan simülasyonun başlangıcı.....	70
Şekil 4.44. 100ns simülasyon sonunda PSS5 proteine spesifik olmayan bir bölgeden bağlanması.....	70
Şekil 4.45. Su içerisindeki lizozim proteininin farklı iyon kaynağı sıcaklıklarında ve 3.0 kV kapiler voltajında gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 9+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.....	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. 7+ yükte lizozim proteininin ve PSS3-4-5 komplekslerinin Rg değerleri çizelgesi. Çizelgede ilk 1ns ve son 100ns arasındaki seçili veriler sunulmaktadır.	69
Çizelge 4.2. Vakum ortamda PSS5 in proteine özgün bölgeden bağlanmaması sonucu Rg değerleri. (İlk 1ns ve son 100ns gösterilmiştir.)	71
Çizelge 4.3. Sitokrom c yüke ve sıcaklığa göre CCS değerleri.	88
Çizelge 4.4. Sitokrom c için iyon kaynağı sıcaklığının yükler üzerine etkisi (100 °C ve 150 °C kıyaslaması).....	89
Çizelge 4.5. Lizozim yüke ve sıcaklığa göre CCS değerleri.	90
Çizelge 4.6. Lizozim için iyon kaynağı sıcaklığının yükler üzerine etkisi (100 °C ve 150 °C ta kıyaslaması).....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

\AA	Angstrom
e	Elektron yükü
E	Elektriksel alanın şiddeti
K	İyon hareketlilik sabiti
K_0	İndirgenmiş iyon hareketlilik sabiti
k_b	Boltzmann sabiti
N	Sürükleyici gaz yoğunluğu, hacim başına düşen molekül sayısı
P	Basınç
P_0	Standart basınç
T	Sıcaklık
T_0	Standart sıcaklık
V_d	Sürüklenme hızı
z	İyonun yükü
Ω	Etkin çarpışma kesiti

Kısaltmalar

1HRC	Protein data banktan alınan at kalbinden elde edilen sitokrom c X-ışını ile katı fazdaki kristalinden elde edilmiş protein yapısının adı
------	--

1AKI	Protein data banktan alınan tavuk yumurtasından elde edilen lizozim X-ışını ile katı fazdaki kristalinden elde edilmiş protein yapısının adı
AA	Bütün atomlar
AAC	Amonyum Asetat
ACN	Asetonitril
CCS	Etkin Çarpışma Kesiti
CG	Kaba taneli
CytC	Sitokrom c
Da	Dalton
DC	Doğru akım
D	Dimer
EI	Elektron İyonlaştırma
ESI	Elektrosprey İyonlaşma
FF	Kuvvet Alanı
HEPES	(4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit)
IMS	İyon Hareketliliği Spektrometrisi
IMS-MS	İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi
Lys	Özellikle anlamı belirtilmemiş ise lizozim anlamı taşır.
M	Molekül kütlesi
M8+	8+ yüklü monomer özellikle belirtilmemiş ise $[M+8H]^{8+}$
	anlamındadır.
MD	Moleküler Dinamik
MeOH	Metanol
MS	Kütle Spektrometrisi
M _w	Ağırlıkça ortalama molekül kütlesi

NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
Q/ToF	Dört kutuplu uçuş zamanlı
pI	İzoelektrik nokta
TOF	Uçuş zamanlı
T	Trimer
TIMS	Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisi
Tris-HCl	Tris(Hidroksimetil)Aminometan-Hidroklorik asit
TMLJ	LennardJones yörünge metodu
Plume	Elektrospreyin vakuma doğru püskürtülmesi sonucunda meydana gelen çözelti-gaz fazının bir arada bulunduğu bulut
E	Geniş yapılı konformer (Extended)
C	Kompakt yapılı konformer
PSS	Polistrensülfonat
PSS2	2mer Polistrensülfonat
RF	Radyo Frekansı
R _g	Eylemsizlik yarıçapı (Radius of gyration)
IMoS [1]	İyon hareketliliği etkin çarpışma kesiti hesaplama programı
Xışını-PDB	Protein Data Bank üzerinden alınan kristal yapıdaki protein dosyasının adı (Ek olarak Şekillerde Xray-PDB olarakta yazmaktadır.)

1. GİRİŞ

Yaşamın mihenk taşlarından biri olan proteinler canlı organizmalarda büyük önem taşır. Hücrel iletişim ve birçok metabolik reaksiyonu katalize ederek yaşamsal faaliyetlerde görev alırlar. Biyolojik sistemlerde hücrel proteinlerin fonksiyonu ve aktivitesi üç boyutlu yapılarına göre belirlenir [2]. Proteinler, biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için yapılarında katlanmalar meydana gelir ve bu katlanmalar hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimlerle konformasyon kararlılığı veya konformasyondaki değişimleri sağlar [3]. Literatürde pH ve organik çözelti değişimlerinin proteinlerin konformasyonları üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çok çalışma bulunmaktadır [4–7].

Karmaşık bir karışıma uygulanan bazı analiz yöntemleri (Circular Dichroism, NMR, vb.), genelde karışım içerisindeki belirli bir türle ilgili analitik bilgiyi açığa çıkaramaz. Bunun başlıca nedenleri, tüm türler için aynı anda alınan verilerde; örnek içerisinde düşük bollukta bulunan bir türün analizinde bu veriyi baskılayan yüksek bollukta diğer bileşenlerin bulunabilmesi, verinin sadece ilgili türe özgü olmayıp tüm bileşenlerin ortalamasının karakteristik özelliği olması veya verilerin yorumlanamayacak kadar karmaşık olması olarak ifade edilebilir [8]. Ek olarak bu tür analiz yöntemlerinde analitin yüksek saflıkta olması da önem arz eder.

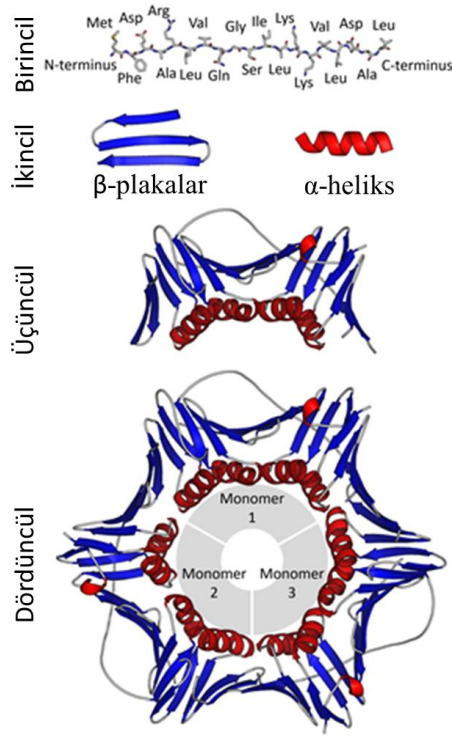
Son yıllarda en hızlı gelişen analitik araçlardan biri olan kütle spektrometrisi [9] (Mass Spectrometry, MS), hassasiyet, hız, analiz için az miktardaki örnek gereksinimi ve karmaşık örnekleri analiz edebilme kabiliyeti gibi avantajları ile bu tür sorunların üstesinden gelinebilmesini sağlamaktadır [8].

Öte yandan, kütle spektrometrisi ile birlikte iyon hareketliliği tekniğinin birlikte kullanıldığı sistemlerde de analitin gaz fazında analiz edilmesinden kaynaklı olarak çözelti fazındaki protein konformasyonları hakkında elde edilebilecek bilgiler sınırlıdır. Literatürde gaz fazının çözelti fazını ne kadar yansıttığı hakkında bir çok çalışma bulunmaktadır [8, 10, 11]. Protein dinamiklerinin daha iyi anlaşılması ve gelecekte bu

sınırın aşılması durumunda şüphesiz kütle spektrometrik yöntemler ile ilgili konformasyon çalışmaları diğer analitik yöntemlerin çok daha üstünde olacaktır. Bu tez çalışması da bu yolun aydınlatılmasında küçük bir mum sayılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Proteinlerin Yapısı, Konformasyonu, Katlanmaları ve Fonksiyonunun Önemi



Şekil 2.1. Proteinlerin birincil yapıdaki aminoasit dizilimlerinin katlanarak dördüncül yapıyı oluşturması [12].

Proteinler farklı aminoasit dizilimlerinden oluşup peptit bağları ile bağlıdır. Birçok kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi) katlanarak fonksiyonel hale gelirler. Proteinlerin konformasyonlarının bozulması durumunda işlevlerini yerine getiremedikleri için birçok hastalığa neden olmaktadır buna protein kaynaklı konformasyonel hastalıklar denilebilir.

Konformasyonel hastalıklar, yanlış katlanmış proteinler nedeniyle hücrel fonksiyonların tehlikeye girdiği hastalıklardır. Bu patogenez, demans, amyotrofik lateral skleroz, multipl skleroz, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, çoklu sistem atrofisi ve prion hastalıkları gibi nörodejeneratif bozuklukların gelişiminde önemli bir katkıda bulunan faktördür [13].

Proteinler genellikle kendilerine has kararlı yapıya katlandıklarında fonksiyonel hale gelirler. Doğal durum (N) ile açılmış durum (U) arasındaki basit iki durumlu bir denge söz konusudur:



Gibbs serbest enerjine bağlı olarak protein konformasyonları değişim gösterir:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Entalpik (ΔH) ve entropik (ΔS) terimlere katkıda bulunan birçok faktör vardır. Molekül içi hidrojen bağları ve proteinler ile çözücü arasındaki hidrojen bağ geometrisi ΔH 'ye en büyük katkıda bulunanlardır [14]. Doğal proteinlerde, hidrofobik bölgeler çekirdeğe gömülür. Bu durum entropinin en üst düzeye çıkarılması için proteinin etrafını saran suyun en aza indirilmesine izin verir. Anfinsen'in RNase A'nın katlanması üzerine çalışması ona 1972'de Kimya Nobel Ödülü'nü kazandırdı [15]. Çalışması, proteinin doğal halinin en düşük Gibbs serbest enerjisine sahip konformasyon olduğunu gösterdi. Anfinsen ayrıca amino asit dizisinin proteinin doğal 3D yapısını belirlediğini de gösterdi.

Proteinlerin katlanmasının aminoasit diziliminden çözümlenmesi hücre içerisinde protein yapılarının nasıl davrandığını moleküler seviyede anlayabilmemizi sağlar. Son zamanlarda geliştirilen aminoasit dizilimi üzerinden protein katlanmalarının nasıl olacağını tahmin eden Alpha-Fold adındaki program ile protein dinamiği bilgisayar aracılığı ile açıklanmaya çalışılmaktadır [16]. Protein katlanma dinamiğinin bilinmesi proteinlerin yanlış katlanmasından kaynaklı bir çok hastalığın neden kaynaklandığını açıklamamızı ve bu hastalıklara karşı tedavi yöntemleri geliştirilmesinde öncül rol oynar [17]. Protein içerikli ilaçların konformasyonlarının bozulmadan taşınması için yine protein dinamiği hakkında bilgi sahibi olmak gerekir.

2.1.1. Protein Konformasyonları için Analiz Teknikleri

Optik teknikler, proteinleri incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın örnekler arasında ultraviyole görünür bölge (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi, dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi ve floresan spektroskopisi bulunur. Bu teknikler, elektronların moleküler orbitaller arasındaki geçişini izler. Optik spektroskopinin faydası, kimyasal modifikasyonlar olmaksızın fizyolojik koşullar altında işlev görme yeteneğinde yatmaktadır.

UV görünür bölge spektroskopisinde, çözelti içerisindeki moleküller ışığı absorbe eder. Absorbans miktarı üzerinden, numunenin absorpsiyon katsayısı ve konsantrasyonu belirlenir [18].

CD spektroskopisi, UV'ye göre daha gelişmiş bir tekniktir. CD Kiral moleküller tarafından sol ve sağ polarize ışık arasındaki diferansiyel absorpsiyondan yararlanır. α -heliks, β -plaka ve rastgele sarım gibi farklı ikincil yapılar farklı sinyallere yol açarlar. Bununla birlikte, CD spektroskopisi tarafından sağlanan bilgiler çok fazla ayrıntı sağlamaz, bu nedenle bu yöntem genellikle diğer teknikleri tamamlamak için kullanılır [19].

Floresans, ışığın yayılmasına dayanan bir başka popüler spektroskopik tekniktir. Moleküller uyarılmış durumdan temel duruma döndüğünde ışık yayarlar. Bir indol kromoforu olarak triptofan, çevreye karşı oldukça hassastır, bu nedenle konformasyonel değişiklikler ve moleküller arası etkileşimler hakkında bilgiler verebilir [20].

X-ışını kristalografisi, protein 3D yapılarını incelemek için kullanılan önemli tekniklerden biridir. Proteinler küçük boyutları nedeniyle optik mikroskopla doğrudan gözlenemezler. Bununla birlikte, proteinler içindeki atomik mesafe ($\sim 1.5 \text{ \AA}$), X-ışınlarının dalga boyuna benzer. Sıralı bir kristalde birim hücre, en küçük hacimli eleman olarak tanımlanır. Protein molekülleri, hücre eksenleri boyunca düzenlenen bu birim hücrelerin tekrar eden bir dizisinde hizalanır. Diziler tarafından oluşturulan atomların kristal düzlemleri, X-ışını radyasyonuna maruz kaldığında kırınım desenleri üretir.

X-ışını kristalografisi, atomik olarak çözümlenmiş yapısal veriler için hala altın standart olarak kabul edilmektedir. RCSB Protein Veri Bankası (PDB), üç boyutlu biyomoleküler yapısal veriler için en büyük kaynaktır [21].

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, protein yapısını ve dinamiklerini incelemek için en güçlü araçlardan birisi olduğu söylenebilir. Bir manyetik alanda, çekirdeklerin dönüş enerjisi iki seviyeye ayrılır. Elektromanyetik radyasyonun uygulanması üzerine, her bir çekirdek, yerel ortama oldukça bağımlı olan belirli bir

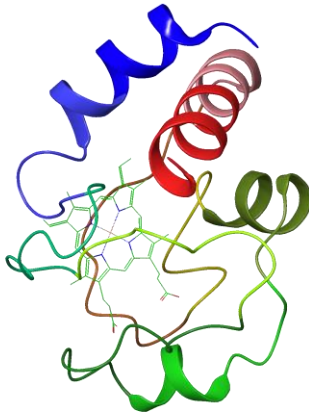
frekansta rezonansa girebilir. Böylece, NMR spektroskopisi yapısal ve dinamik bilgi sağlayabilir. Bununla birlikte, büyük proteinler için rezonansların üst üste gelmesi ve pik genişlemesi önemli sorunlar haline gelir. Üst boyut sınırı yaklaşık olarak 40 kDa'dır [22]. Ek olarak, NMR deneylerinde proteinlerin analiz edilebilmesi için proteinlerin saf ve konsantrasyonları yüksek olmalıdır [22]. Bu durum agregasyon ve yanlış katlanma olasılığını arttırmaktadır.

2002 yılında Kurt Wüthrich, çözültedeki biyolojik sistemler için NMR spektroskopisini geliştirdiği için Nobel Kimya Ödülü'nün bir bölümünü kazandı [23].

Kriyojenik-EM (cryo-EM) de yapısal bilgi sağlayan bir başka yöntemdir. Molekülün farklı projeksiyonları ve yapılanmaları birleştirilerek üç boyutlu veriler elde edilebilir [24]. Bununla birlikte, cryo-EM düşük çözünürlük sıkıntıları bulunmaktadır [25].

Bu tez kapsamında protein konformasyonlarının daha iyi anlaşılması ve kütle spektrometrik yöntemlerle bunların detaylı tanımlanabilmesi için model protein olarak sitokrom c ve lizozim seçilmiştir. Bunun amacı bu proteinlerin molekül ağırlıklarının birbirine yakın olmaları, bazik proteinler olup izoelektrik noktaları benzerlik göstermeleri, bunun yanı sıra bir türde disülfid bağlarının yoğun diğerinde olmaması konformasyona nasıl etki ettiğinin araştırılması için tercih edilmiştir.

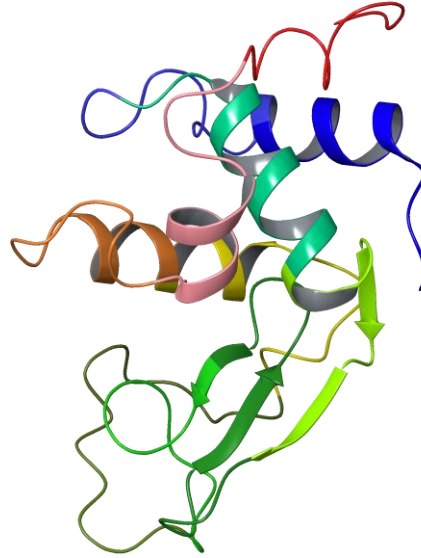
2.1.1.1. Sitokrom c



Şekil 2.2. 1HRC pdb kodlu proteinin ve porfirin IX halkasından oluşan Fe^{2+} içeren HEC ligandının görüntüsü [26]. (Maestro [27] programı kullanılarak oluşturulmuştur.)

Sitokrom c proteini, yaklaşık 12360 Da ağırlığında olan, yaşamı destekleyen ATP sentezinin işlevinde kilit bir katılımcı olarak mitokondrideki işleviyle bilinir. Bununla birlikte, bir hücre apoptotik bir uyarı aldığı anda, sitokrom c sitozole salınır ve apoptoz yoluyla programlanmış hücre ölümünü tetikler. Sitokrom c ve sitokrom-c aracılı apoptozun salınımı, çok sayıda düzenleme katmanı tarafından kontrol edilir [28].

2.1.1.2. Lizozim



Şekil 2.3. 1AKI pdb kodlu proteinin görüntüsü [29]. (Maestro [27] programı kullanılarak oluşturulmuştur.)

Lizozim proteini, yaklaşık 14310 Da ağırlığında olan, insanlarda, solunum yollarında patolojik savunmada rol alır. Lizozim, bir litik enzim (mikroorganizmaların hücre duvarlarının geçirgenliklerini bozan ya da fiziksel olarak parçalayan enzim) ve küçük bir katyonik protein olarak ikili aktiviteleri aracılığıyla, hücre duvarı peptidoglikanlarını sindirerek, bakteri zarlarını parçalar ve bakteri hücre duvarındaki otolitik enzimleri aktive ederek bakterilere zarar verir veya onları öldürür. Lizozim, submukozal bezler, nötrofiller ve makrofajlar tarafından salgılanır. Çoğu bakteriye karşı lizozim, diğer antimikrobiyal polipeptitlerle beraber daha etken olarak hareket eder. Lizozim eksikliği, tekrarlayan

sinüzit, hiyalin membran hastalığı ve erken evre kistik fibrozun patogenezinin neden olabilir [30].

2.2. Protein-Polielektrolit Etkileşimleri

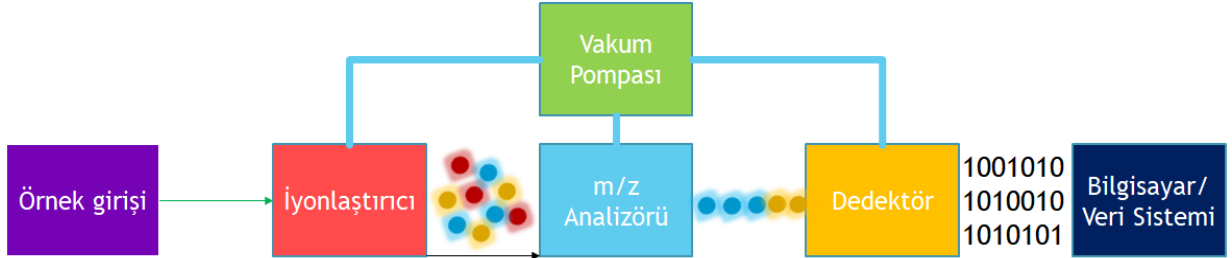
Bir polielektrolit, birkaç tekrar eden zincir birimine sahip bir elektrolit polimeridir. Aynı zamanda polielektrolitler, su gibi polar bir çözücü içinde çözüldüklerinde kendilerine kovalent olarak bağlı (çok sayıda) yüklü gruba sahiptirler. Genel olarak, polielektrolitler bu tür çeşitli gruplara sahip olabilir. Homojen polielektrolitler, yalnızca bir tür yüklü gruba sahiptir, örneğin sadece karboksilat grupları [31].

Polielektrolit-protein etkileşimleri ve sulu çözeltide proteinlerin zıt yüklü polielektrolitler ile kompleks oluşumu üzerine yapılan çalışmaların tarihi, geçen yüzyılın ortalarına kadar uzanmaktadır [32]. Protein-polielektrolit arasındaki etkileşimlere genel olarak elektrostatik kuvvetler hakimdir ve bu nedenle pH ve iyonik şiddet gibi parametrelerdeki değişimler bu etkileşimler üzerinde belirleyici role sahiptir [33]. Polielektrolit zincir sertliği [34], doğrusal yük yoğunluğu [35], net yük ve yüklerin dağılımı [36], ve protein yüzeyindeki hidrofobik bölgeler [37], polielektrolit--protein ve protein-protein etkileşimlerini etkileyebilecek diğer önemli faktörlerdir.

Kuşkusuz bu kompleksler sağlık ve gıda gibi yaşama dair uygulamalarda etken role sahiptir. Polielektrolitler, protein çözünürlüğünün, konformasyonlarının [38] ve işlevselliğinin değiştirilmesini sağlayarak ilaç taşınım sistemleri [39], biyoteknoloji [40] ve işlenmiş gıda uygulamaları vb. konularda etkinliği ve verimi artırır. Kütle spektrometrik tekniklerle yapılan analizlerde var olan vakum ortamında çözelti etkeni düşük olduğundan moleküller (bu örnekte protein ve polielektrolitler) arasındaki etkileşimler hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edebilmemiz mümkündür [41].

2.3. Kütle Spektrometrisi

Tanım olarak, kütle spektrometrisi (MS) bir iyon kaynağı aracılığı ile iyonlaştırılmış analitlerin m/z oranını ölçen bir kütle analizöründen ve her biri farklı m/z değerindeki iyon sayısını kaydeden bir dedektörden oluşur [42].



Şekil 2.4. Kütle spektrometrisinin genel diyagramı.

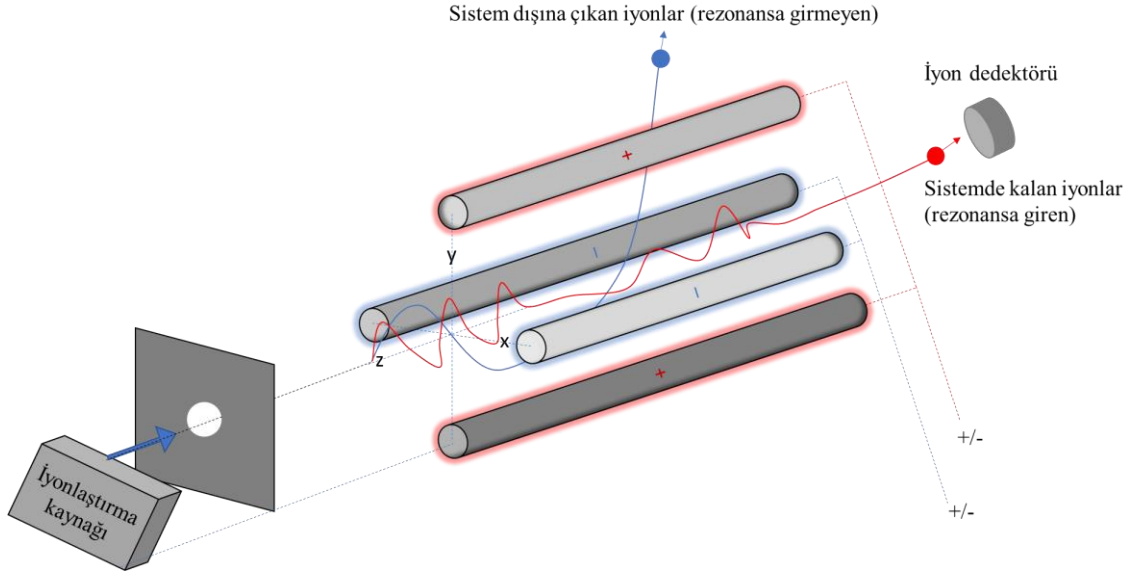
Burada m, Dalton cinsinden iyon kütesidir ve z temel yük cinsinden yüküdür. Kütle spektrometrisinin temelleri, J. J. Thomson'ın elektron arayışı sırasında atılmış ve 20. yüzyılın başlarındaki sonraki gelişmeler ile kullanımı, izotopik dağılımları karakterize etmeye ve organik bileşikleri tanımlamaya kadar genişletilmiştir [43]. Daha sonraki gelişmeler, biyolojik makromoleküller ve yapısal MS çalışmaları konusunda MS için kapıyı açmıştır. Günümüzde, geleneksel araştırma ortamlarındaki kullanımlarının yanı sıra, MS, adli tıp [44] ve uzay araştırmaları gibi çeşitli alanlarda da uygulanmaktadır [45]. Kütle spektrometrisi, hassasiyeti yüksek, hızlı, az miktardaki örnek tüketimi ve karmaşık karışımların analizini gerçekleştirebilecek etkin bir analitik sistem olarak kabul görmüş durumdadır [8].

2.3.1. Kütle Analizörleri

Gaz halindeki iyonları m/z'lerine göre ayırmak için bir kütle analizörü gereklidir. Çeşitli tipte kütle analizörleri mevcuttur; bunlara Orbitrap, Fourier transform iyon siklotronu (FT-ICR), dört kutuplu, iyon tuzakları ve uçuş süresi (TOF) analizörleri dahildir [46]. TOF ve dört kutuplu kütle analizörleri bu çalışmada kullanıldığından, bu özel teknikler biraz daha detaylı olarak tartışılacaktır.

2.3.1.1. Dört Kutuplu kütle analizörü

Bu kütle analizörü, farklı değerlerde yüklenebilir dört kutba karşılık gelen dört adet paralel metal çubuktan oluşur. Her karşıt çubuk çifti, elektriksel olarak birbirine bağlanır ve bir çift çubuk ile diğeri arasına DC voltajına sahip bir radyo frekansı (RF) voltajı uygulanır.

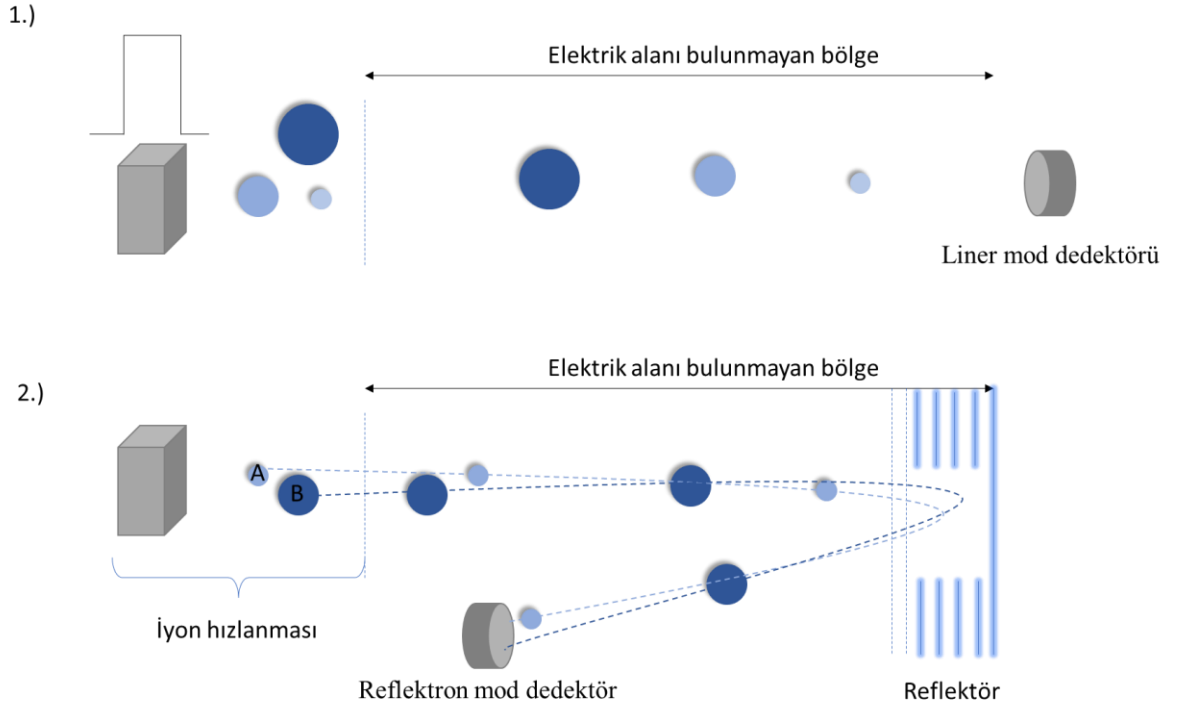


Şekil 2.5. DC/RF voltajlarının belirli bir kombinasyonu sayesinde, yalnızca seçilen m/z değerine (kırmızı çizgi) sahip iyonlar dört kutuplu kütle analizöründen geçebilir. Diğer m/z değerleri kararsız yörüngelere sahiptir (mavi çizgi).

İyonlar, çubuklar arasındaki dört kutuptan dedektöre doğru hareket eder. Belirli bir voltaj oranı için yalnızca belirli bir kütle/yük oranına sahip iyonlar dedektöre ulaşır. Diğer iyonların yörüngeleri kararsızdır, çubuklarla çarpışır veya sistemden dışarı çıkar. Bu, belirli bir m/z değerine sahip bir iyonun seçilmesinde uygulanan voltajı sürekli olarak değiştirerek bir dizi m/z değerleri için tarama yapmasına izin verir [47].

2.3.1.2. Uçuş Zamanlı kütle analizörü

Uçuş zamanlı (Time of Flight, TOF) Analizörleri, elektrik veya manyetik alan kullanmadan iyonları zamana göre ayırır. Kaba anlamda, TOF kromatografiye benzer, ancak durağan/hareketli faz yoktur, bunun yerine ayırma işlemi iyonların kinetik enerjisine ve hızına dayanır.



Şekil 2.6. TOF analizöründe liner mod ile reflektör modun çalışma prensibi.

Aynı yüklerin iyonları eşit kinetik enerjiye sahiptir; Uçuş tüpündeki iyonun kinetik enerjisi, iyon kaynağından ayrılırken iyonun kinetik enerjisine eşittir.

Ne yazık ki, daha yüksek kütlelerde uçuş sürelerinin uzun olmasından kaynaklı çözünürlük düşüktür. Ayrıca yüksek kütlelerde, aynı m/z değerlerine sahip iyonların tümü ideal TOF hızlarına ulaşamaz. Bu sorunu çözmek için genellikle analizöre bir reflektör eklenir. Reflektör, uçuş tüpünün ucuna yerleştirilmiş çok yüksek voltajlı bir dizi halka elektrottan oluşur. Bir iyon reflektöre girdiğinde, yüksek voltaj nedeniyle ters yönde yansıtılır. Reflektör, tek bir m/z değeri için uçuş sürelerinin geniş bant aralığını daraltarak çözünürlüğü artırır. Daha hızlı iyonlar reflektörlere doğru ilerler ve daha yavaş iyonlar reflektöre daha az gider. Bu şekilde, aynı m/z değerindeki hem yavaş hem de hızlı iyonlar, dedektöre farklı zamanlarda değil, aynı zamanda ulaşır ve sinyal için bant genişliğini daraltır [46].

2.3.2. Dedektör

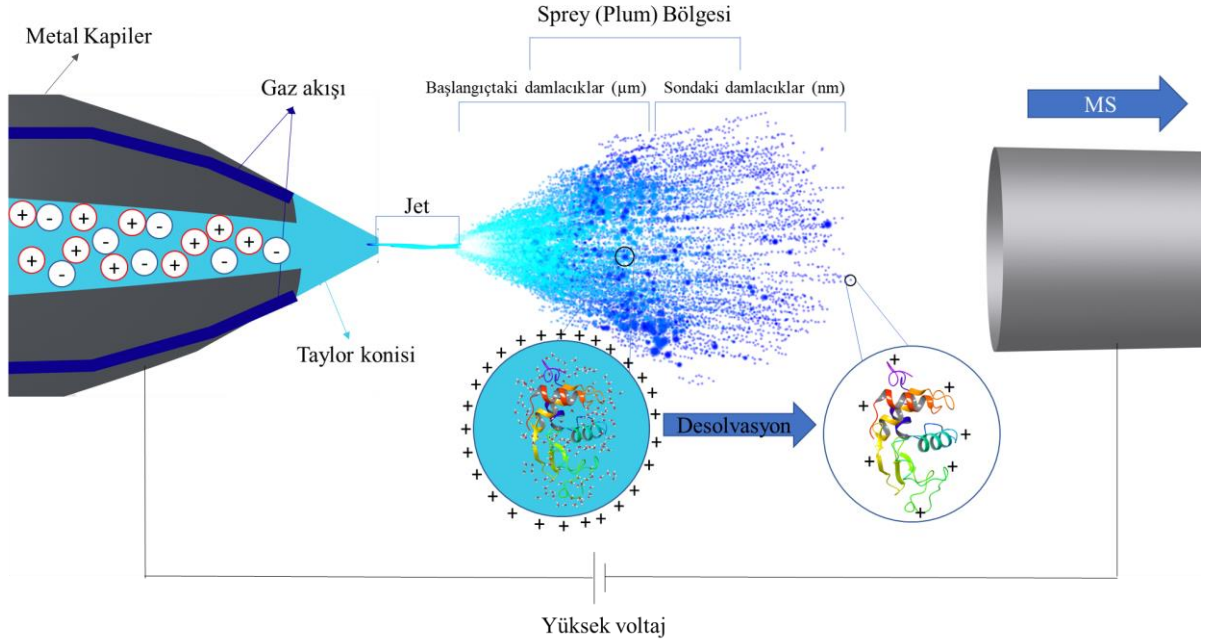
İyonlar kütle analiz cihazından geçtikten sonra dedektör tarafından algılanır ve bir bilgisayar tarafından kullanılabilir sinyale dönüştürülür. Dedektörler, gelen iyonların bolluklarına bağlı olarak bir elektrik akımı üretebilir [48].

2.4. İyonlaştırma teknikleri ve Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)

İyon kaynağı, gaz fazında yüklü iyonlar üretir. Birçok farklı iyonlaştırma stratejisi geliştirilmiştir. Elektron iyonlaştırma (EI), yaklaşık bir yüzyıldır [49] hem katı hem de gaz analitler için kullanılmaktadır. EI küçük moleküllerin saptanmasında ve tanımlanması için etkili olduğu kanıtlanmıştır. Kimyasal iyonlaştırma yaklaşımları (CI) [50] dahil olmak üzere diğer teknikler de (hızlı atom bombardımanı (FAB), alan iyonlaştırma (FI) ve alan desorpsiyonu (FD)) bu alanda başarılı olmuştur.

Ne yazık ki, analit ve yüklü parçacıklar arasındaki gaz fazı çarpışmalarına dayanan bu "sert" iyonlaştırma teknikleri, büyük analitler (protein ve biyolojik moleküller gibi) için daha da kötüleşen bir sorun olan çoklu parçalanmaya yol açar.

1980'lerin sonlarında geliştirilen iki "yumuşak" iyonlaştırma yönteminden Karas ve Hillenkamp [51] tarafından geliştirilen matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI) tekniğinde, organik bir "matriks" ile birlikte kristalize edilmiş bir türü iyonlaştırmak için lazer kullanılır. MALDI tekniğindeki iyonlaşmanın kesin mekanizması hala kapsamlı bir şekilde anlaşılmamıştır [52], ancak gaz fazında parçalanmamış makromolekül iyonlarını ürettiği bilinmektedir.



Şekil 2.7. ESI-MS sisteminin basitleştirilmiş gösterimi.

ESI ilk olarak 1980'lerin ortasında Fenn [53] tarafından MS ile birleştirilmiştir. Biyomoleküllerin analizini sağlayan bu teknik sayesinde 2002 yılında Nobel kimya ödülüne layık görülmüştür.

ESI tekniğinde genellikle seyreltik (polar uçucu çözücülerde mM'dan az) analit çözeltisi mekanik şırınga pompasıyla, iğne veya paslanmaz çelik kapiler (~0.2 mm dışçap ve ~0.1 mm iç çap) kullanılarak düşük akış hızında (tipik olarak 1–20 µL/dk) püskürtülür. Kaynak konisine (MS tarafındaki) veya ısıtılmış kapilere (tipik olarak püskürtme iğnesi ucundan 1-3 cm uzaklıkta bulunur) ve metal kapilerin uç kısmına yüksek voltajlar (2–6 kV) uygulanır. Bu güçlü elektrik alanı, analit çözeltisinin yüksek yüklü elektrosprey (ES) damlacıklarından oluşan bir aerosol halinde dağılmasına neden olur (Şekil 2.7.). Analitin gönderildiği kısımdaki kapiler çevresinde koaksiyel bir kılıf (sheath) gazı (kuru N₂) akışı daha iyi püskürme sağlar. Bu gaz akışı ayrıca kılcal uçtan çıkan spreyn kütle spektrometresine doğru yönlendirilmesine yardımcı olur. Yüklü damlacıklar, azot akışı (kurutma gazı) tarafından desteklenen çözücünün buharlaşmasıyla µm mertebesinde nm mertebesine küçülerek analitler vakum ortamın bulunduğu kütle spektrometresine doğru yol alır [54].

ESI, analitin moleküler olarak yavaşça gaz fazına geçirildiği "yumuşak" bir iyonlaştırma sağlar [8]. Bu yöntemle protein yapısı olabildiğince yumuşak bir biçimde iyonlaştırılır [55]. İyonlaştırma işlemi sonucunda yük durumunun dağılımı proteinin yapısı hakkında bilgi verir [56]. Katlanmamış proteinlerin yüzeyleri daha büyük olduğundan proton alma eğilimi fazladır dolayısıyla daha yüksek yükte türler oluştururlar [56]. Elektrik geçirgenliğinin düşük olduğu vakum ortamında, fazla yüklenen türlerde molekül içi kulombik itişmeler meydana gelir [56]. Bundan dolayı gaz fazında katlanmış ve kompakt yapıdaki en düşük yükte olan protein, doğal proteine en yakın yapıyı yansıttığı düşünülmektedir.

Çok yüklü iyonlar üretebilen "yumuşak" bir iyonlaştırma tekniği olarak kabul edilen ESI tekniğindeki "Yumuşaklık" terimi, iyonlaşma işlemi sırasında analitlere iletilen minimum iç enerjiyi ifade eder [57]. Yumuşaklık özelliği, çözelti içerisindeki proteinin yapısı bozulmadan analiz etme amacı taşır.

Analit çözeltisindeki yükün elektroforetik ayrılması, yük biriktikçe bu potansiyel tarafından yönlendirilir ve menisküsü deforme ederken, kılcal uçta bir Taylor konisi [58] oluşmasına neden olur. Kulomb itme yüzey gerilimini aştığında, Taylor konisinden yüksek yüklü bir jet yayılır [59].

Bu damlacıkların yüzeyindeki yük yoğunluğu, aşağıdaki formülle hesaplanabilen Rayleigh sınırında [60] kulombik itmenin yüzey geriliminin üstesinden gelinene kadar çözücü buharlaşmasıyla birlikte zamanla artar:

$$Z_R = \frac{8\pi}{e} \sqrt{\epsilon_0 \gamma r^3}$$

Burada Z_R Rayleigh sınırı ve e , temel yüklerin sayısıdır. ϵ_0 vakum geçirgenliğidir, γ çözücünün yüzey gerilimidir ve r damlacık yarıçapıdır. Damlacık bölünmesi Rayleigh sınırında meydana gelir ve daha küçük damlacıklar üretir. Birkaç buharlaşma/fisyon döngüsünden sonra, çoklu protonlanmış protein iyonları gaz fazına salınır.

2.5. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) Mekanizması

ESI-MS tekniğinin geliştirilmesinden sonra, 1990'ların başında analitin ES prosesi tarafından çoklu yüklenmesini yorumlamak için birçok farklı varsayım ve hipotez ortaya atılmıştır [61]. O zamanlar, ESI-MS spektrumlarındaki yük durumlarının dağılımının,

nötr çözültideki dengesine göre analitin (örneğin proteinlerin) yüklenme derecesini yansıttığı düşünülüyordu [62]. Ancak daha sonra yapılan araştırmalar sonucunda çözelti yüklemesi ile elektrosprey yüklemesi arasında bir ilişki olmadığı ortaya çıkarılmıştır [63]. Bu çalışmalarda pozitif iyon modunda ES iyonlaştırması ile bazik çözelti içerisindeki (pH=10) analitin (miyoglobin proteini) pozitif yüklü iyonlarının ve negatif iyon modunda asidik çözelti (pH=3) içerisindeki aynı analitin negatif yüklü iyonlarının gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu gözlemler, ESI'deki yüklenme işleminin düşünülen tamamen farklı bir şekilde gerçekleşebileceğini göstermiştir

ESI ve MS arasında oluşan yüksek basınç farkından kaynaklı olarak iyonlar, vakum ortama geçtiklerinde basıncın düşmesi sonucu adyabatik genişlemeye uğrarlar. Bu durumda iyonlar hız kazanırken (dönüşümsel enerji) iç enerjileri azalarak soğur [56]. İyonların soğuması sonucunda ortamdaki su buharı ile donmuş partiküller veya istenmeyen kümelenmeler oluşmaktadır [56]. Bu duruma karşı ESI kaynağında iyonları ısıtma, çözücü uzaklaştırıcı (desolvasyon) gaz ile hızlandırıcı voltaj parametreleri bulunur. Kurutucu azot gazı ile yumuşak çarpışma işlemi iyonları aktif etmeyecek şekilde çözücüyü iyonlardan ayırır aynı zamanda iyonların iç enerjilerinin korumasını da sağlar.

2.5.1. Fizyolojik ortam için kullanılan uçucu olmayan tuzların ESI üzerindeki olumsuz etkisi

İyonlar ve proteinler arasındaki etkileşimler, protein yapısını ve işlevini önemli ölçüde etkileyebilir [64]. Proteinlerin ve protein komplekslerinin doğal yapılarını ve işlevlerini korumak için genellikle tuzların yüksek iyonik kuvvetleri gereklidir [65]. Tuzlar, çoklu pikler verebilen protein ve protein kompleks iyonlarına katılabilirler. Bu, büyük iyonlar proteinlerdeki translasyon sonrası modifikasyonları veya benzer kümelere sahip proteinleri tespit etme ve tanımlama yeteneğini azaltır. Tuzlar, temel gürültüyü artıran ve duyarlılığı önemli ölçüde azaltan analit iyonlarını bastırmaya neden olan kümeler oluşturabilir [66–68]. Protein çözültülerinde 10 mM kadar düşük konsantrasyonlarda dahi Tris-HCl, HEPES, fosfat gibi tamponlar mevcutsa, protein kompleksi iyonlarının bireysel yük durumlarının MS tarafından çözülmesi zor olabilir [69].

Amonyum iyonu, proteinlere veya protein komplekslerine katılma (adduct) yapmadığından, protein ve protein komplekslerinin ESI-MS analizlerinde, bu tür uçucu olmayan tamponlar yerine (Tris-HCl, HEPES, fosfat vb.) uçucu amonyum tuzu çözültileri

tercih edilmektedir. Amonyum asetat tuzu, doğal form (native) ESI-kütle spektrometrisi analizlerinde yaygın olarak kullanılır. Amonyum bikarbonat ESI-MS analizlerinde yaygın olarak kullanılmakta olan tuzlardan bir diğeridir [70].

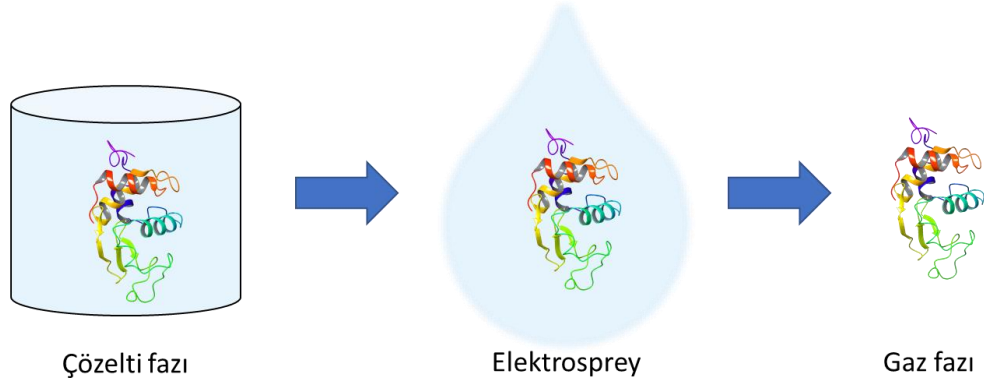
2.5.2. Amonyum Asetat ve Amonyum bikarbonat ile hazırlanan uçucu tuzların kullanımı

Proteinin doğal konformasyonlarının araştırılmasında ESI-MS, protein ve biyomoleküler komplekslerin yapılarının bozulmadan çözüldüğü gaz fazına transferini içerir. Analit halen çözücü ile çevriliyken pH kaynaklı değişikliklerin meydana gelmesi sonucu protein bu tür durumlardan etkilenmektedir. Çoğu doğal ESI-MS çalışmasında, nötral pH da sulu amonyum asetat çözeltilerini kullanır. Amonyum asetatın analit çözeltilerini nötr pH'de tamponladığı yaygın olarak devam eden bir yanıştır. Tanım olarak, bir tampon, konjuge asit ve baz çiftini içerir. Tamponlama aralığı, zayıf asit pKa \pm 1 pH birimini kapsar. NH₄⁺ ve CH₃-COO⁻ konjuge asit/baz çifti değildir, bu da pH 7'de tampon oluşturmadıkları anlamına gelir. Amonyum asetat tuzunun suda çözünmesi pH=7 ile sonuçlanır, ancak bu pH oldukça kararsızdır. Amonyum asetat, pH=4,75 (asetik asidin pKa'sı) ve pH=9,25 (amonyumun pKa'sı) civarında tamponlama sağlar. Pozitif iyon modunda elektrosprey edilen nötral amonyum asetat çözeltilerinin, ESI duman bulutu (plume) pH=4,75 \pm 1'e kadar asitleşmeye maruz kalacağı anlamına gelir. Negatif iyon modunda ise pH=9,25 \pm 1'e kadar bazikleşme gösterir. Amonyum asetat yine de uçuculuğu sayesinde diğer fizyolojik tamponlara göre halen kullanılmaktadır. Aynı zamanda fizyolojik koşullar altında proteinlerin solvasyon özelliklerini taklit edebilen bir elektrolittir. Ayrıca, pH 7'den pH=4,75 civarına bir düşüş, saf suda gerçekleşecek asitleşmeden daha az değişkenlik gösterir [70]. ESI-MS için pH=7 çözeltilerine amonyum asetat "tampon" olarak atıfta bulunulmaması gerekir. Bunun yerine amonyum asetat "çözeltisi" kullanılmalıdır.

Amonyum bikarbonat, HCO₃⁻'nin pH=7 çözeltileri için makul bir eşleşme olan 6.4'lük bir pKa'ya sahip olduğu düşünüldüğünde güzel bir seçenek olarak görülebilir [71]. Ne yazık ki, amonyum bikarbonat, ESI sırasında damlacık aşamasında CO₂ gazının dışarı atılmasıyla oluşan kabarcıklarla protein etkileşimlerinden kaynaklı proteinin açılmasına sebebiyet vermektedir [72]. Bu istikrarsızlaştırıcı etki nedeniyle, ESI-MS'de protein yapısının doğal analizinde amonyum bikarbonattan kaçınılması gerekir.

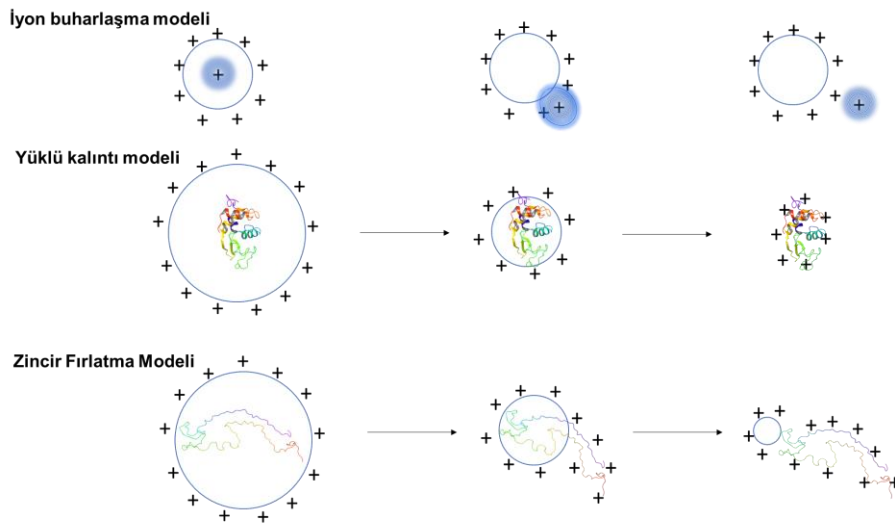
2.5.3. Çözelti Fazından Gaz Fazına Geçiş

ESI olayında gerçekleşen, iyon türlerinin damlacıklardan gaz fazına aktarıldığı mekanizmalar hala tartışılmaktadır [73]. Literatürde gaz fazı protein iyonlarının oluşumuyla ilgili birkaç mekanizma önerilmiştir.



Şekil 2.8. Çözelti fazından gaz fazına geçişin kabaca resmedilmesi

Bunlardan başlıcaları, iyon buharlaşma modeli (Ion Evaporation Model, IEM), yüklü kalıntı modeli (Chain Residue Model, CRM) ve zincir fırlatma modeli (Chain Ejection Model, CEM) olarak ifade edilebilir. Modellerin hepsinde iyonların nanometre ölçeğindeki damlacıklardan oluştuğu tahmin edilmektedir, ancak iyon salma mekanizmasında farklılıkları bulunmaktadır.



Şekil 2.9. İyon buharlaşma modeli (IEM), yüklü kalıntı modeli (CRM) ve Zincir fırlatma modeli. (CEM)

2.5.3.1. İyon Buharlaştırma Modeli (IEM)

IEM, damlacıkların birkaç nanometrelik bir yarıçapın altına düştüğünde, yüzey yük yoğunluğunun Rayleigh sınırına yaklaşmasıyla yüklü iyonların doğrudan damlacıktan yayılarak yükü attığını öne sürer [74].

IEM'nin, NH_4^+ ve CH_3COO^- gibi önceden oluşmuş küçük iyonlar için baskın iyon oluşum mekanizması olduğu düşünülmektedir, ancak aynı zamanda protein iyonlarının gaz fazına girebileceği bir mekanizma olarak da önerilmiştir [75]. ESI sürecinin simülasyon çalışmaları, genel olarak IEM'nin çoğunlukla küçük moleküllere ait olduğu görüşünü desteklemektedir [76–78]. Ek olarak son zamanlarda düşük kütledeki proteinlerin (12.4 kDa na kadar) IEM yoluyla yüklendiği düşünülmektedir [79].

2.5.3.2. Yüklü Kalıntı Modeli (CRM)

CRM, Dole tarafından ESI üzerindeki çalışmalarında önerilmiştir [80]. Bu model sadece tek bir analit iyonu içeren birçok damlacığın olduğunu varsayar. Çözücü bu damlacıklardan buharlaştıkça, yük transfer reaksiyonları veya iyonik çekim yoluyla geriye kalan yük kalıntı üzerinde bırakılır ve yük durumu analit boyutunda Rayleigh yüklü bir damlacığına neredeyse eşit bir yük durumuyla sonuçlanır.

Bu model, doğrudan gözlemlenmemiş olmasına rağmen, proteinlerin ve model polimerlerin [77, 81] hem deneysel hem de simülasyon çalışmalarında iyi bir şekilde desteklenmektedir. Küçük yüklü NaCl kümeleri ve çözülmüş metal iyonları için, moleküler dinamik simülasyonu ile iyon oluşumunun baskın mekanizmasının CRM olduğu gösterilmiştir [78, 82] ve bu mekanizmanın katlanmış proteinler gibi büyük, hidrofilik türler için de baskın olacağı düşünülmektedir.

2.5.3.3. Zincir Fırlatma Modeli (CEM)

Protein iyonu oluşumuyla ilgili bir model olan CEM, katlanmamış proteinlerin asidik ve bazik bölgelerden protonlanması yoluyla yüklenme ile birlikte damlacıktan çıkmasını önermektedir. Bu uzantının, kolombik itmeyi azaltan damlacık iç kısmının dışına uzanan uzatılmış protein zinciri üzerindeki yükleri ayrı ayrı yayarak protein yüklenmesine izin verdiğini öne sürmektedir. Model polimerleri ve polietilen glikol polimerlerini kullanan simülasyonlar bu mekanizmayı desteklemektedir [76, 77].

2.6. İyon Hareketliliği Spektrometrisi

1970'in sonlarına doğru geliştirilen iyon hareketliliği spektrometrisi (Ion Mobility Spektrometry, IMS), sıvı fazın kullanıldığı elektroforeze benzer şekilde; büyüklük, şekil ve yüklerine göre (sürükleyici nötral gazın yardımı ile) gaz faz iyonlarını ayıran analitik bir tekniktir [83]. Bu nedenle, bu tekniğin kütle spektrometrisi ile birleşmesi, analitlerle ilgili tamamlayıcı bilgileri tespit etmek için kullanılabilir [83]. Özellikle iyon hareketliliği-kütle spektrometrisi (Ion Mobility-Mass Spectrometry, IM-MS) tekniği, iyonları bileşimlerine ve yük durumlarına göre karışımlardan ayırır [84]. Bunun yanı sıra, geometrik izomerlerin ayrımı, dinamik aralığın artırılması ve iyonları kimyasal güdültüden ayırt etmesi kütle spektrometrisine göre öne çıkan analitik avantajlarıdır [84]. Son yıllarda IM-MS tekniği özellikle proteomiks [85, 86], glikomiks [87], metabolomiks [88] ve petroleomiks [89] alanlarında analiz edilen karmaşık örneklerin analizlerinde büyük yarar sağlamaktadır.

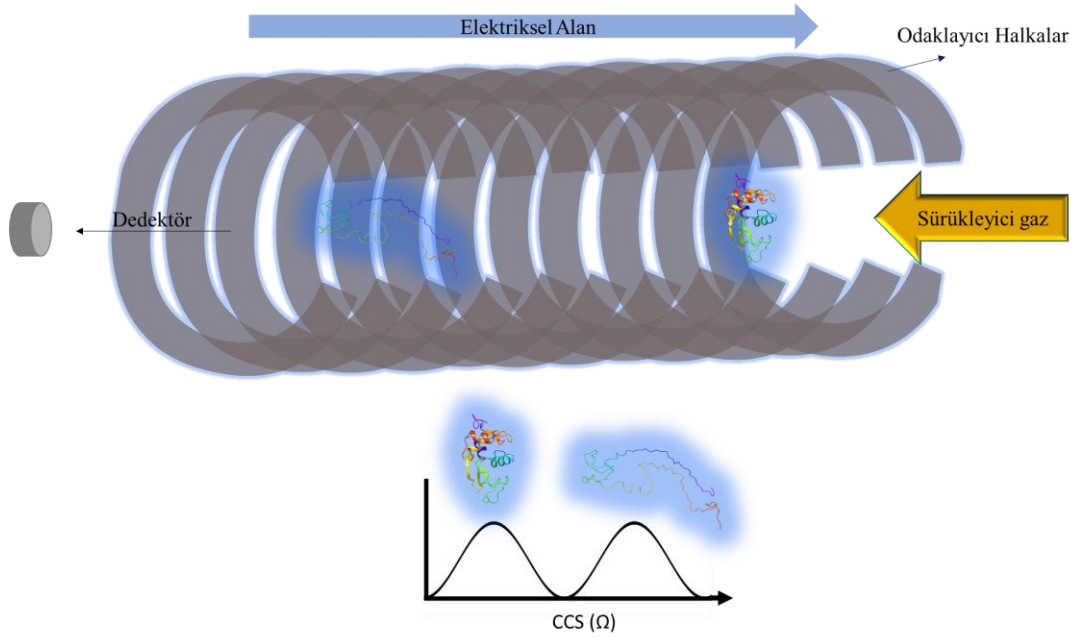
IM-MS tekniği, analiz edilen moleküllerin konformasyonları hakkında detaylı veriler ortaya koymaktadır [90]. IM-MS analizlerinden elde edilen sürüklenme zamanı verilerinden iyonların ortalama momentum transfer etki alanları ile ilişkili bir boyut parametresi olan etkin çarpışma kesitleri (Collision Cross Section, CCS) belirlenebilmektedir [90].

IM-MS deneysel olarak elde edilebilecek bilgileri sınırladığından iyon hareketliliği ayırıcılığının ($R > 50$) artırılma ihtiyacı doğmuştur. Günümüzde bu ayırıcılık değerlerinin iyileştirilmesine yönelik olarak yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir [91].

2.6.1. Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Spektrometrisi

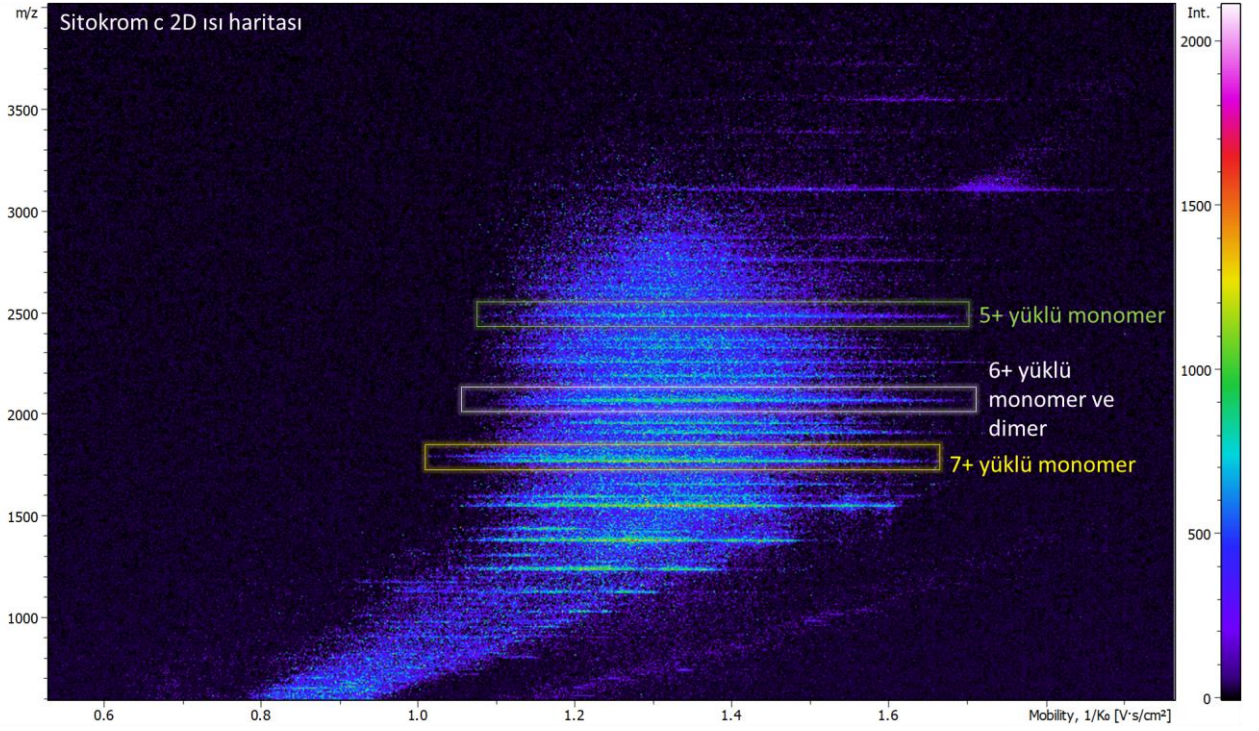
Farklı bir IMS yaklaşımı olan Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometri (Trapped ion mobility spectrometry, TIMS) teknolojisi, iyon hareketlilik ayırımının analitik zorluğa göre gaz hızlarının ve tuzaklama ayarlarının düşükten yükseğe ayarlanabileceği temeline dayanmaktadır [92]. Bu yaklaşımda iyon tuzaklayıcı sistem elektrospreyden gelen karışım iyonlarını toplayarak birbirinden ayrılmış yoğun iyon paketlerine dönüştürür [93]. Kısaca, TIMS'in temelindeki konsept, iyonları hareketli bir gaza karşı sabit tutmak için elektriksel alanın kullanılmasıdır, böylece sürüklenme kuvveti, elektriksel alan tarafından dengelenir ve iyon paketleri, iyon hareketlerine göre ayrılır [84, 92, 94].

Bunlara ek olarak, mutlak sürüklenme sürelerini belirleyebilmek için, iyon salımlarının iyon dedektörleri ile uyumlu bir şekilde yapılması gerekir [56]. Bu nedenle, üstün hızı ve neredeyse sınırsız kütle aralığına sahip TOF analizör, tuzaklamalı IM-MS için uygun bir analizör durumundadır [56].



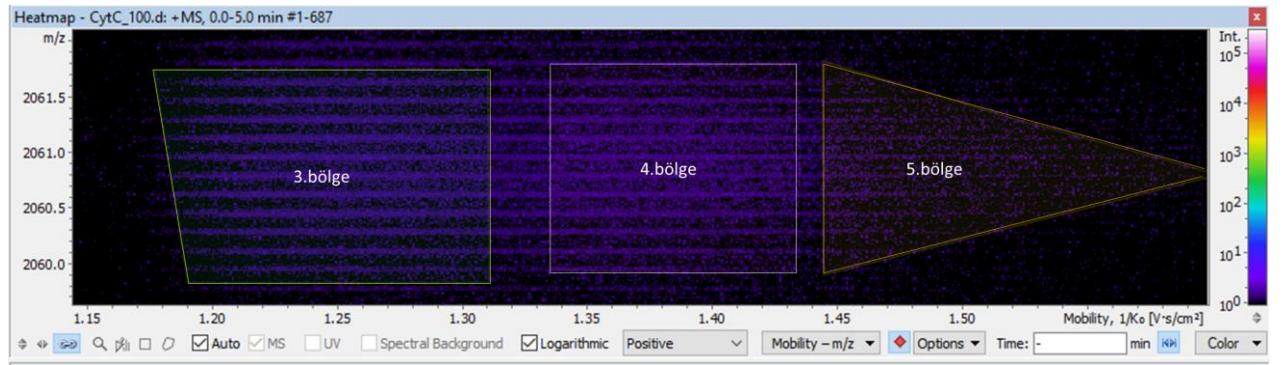
Şekil 2.10. TIMS sisteminde odaklayıcı halkalar sayesinde proteinlerin konformasyonlarına göre birbirlerinden ayırımı sonucunda kompakt yapının düşük, açık yapının yüksek CCS (Ω) değeri aldığı görünmektedir.

Şekil 2.10. 'daki TIMS cihazında istiflenmiş odaklayıcı halkalar düzlemsel elektriksel alan oluşturarak iyonları boyutlarına göre ayırır. Küçük ve daha kompakt moleküller sürükleyici gaz ile daha az çarpışma gösterirken büyük moleküllerde bu durum tam tersinedir. Böylece büyük moleküller daha kısa sürüklenme sürelerine sahiptir.



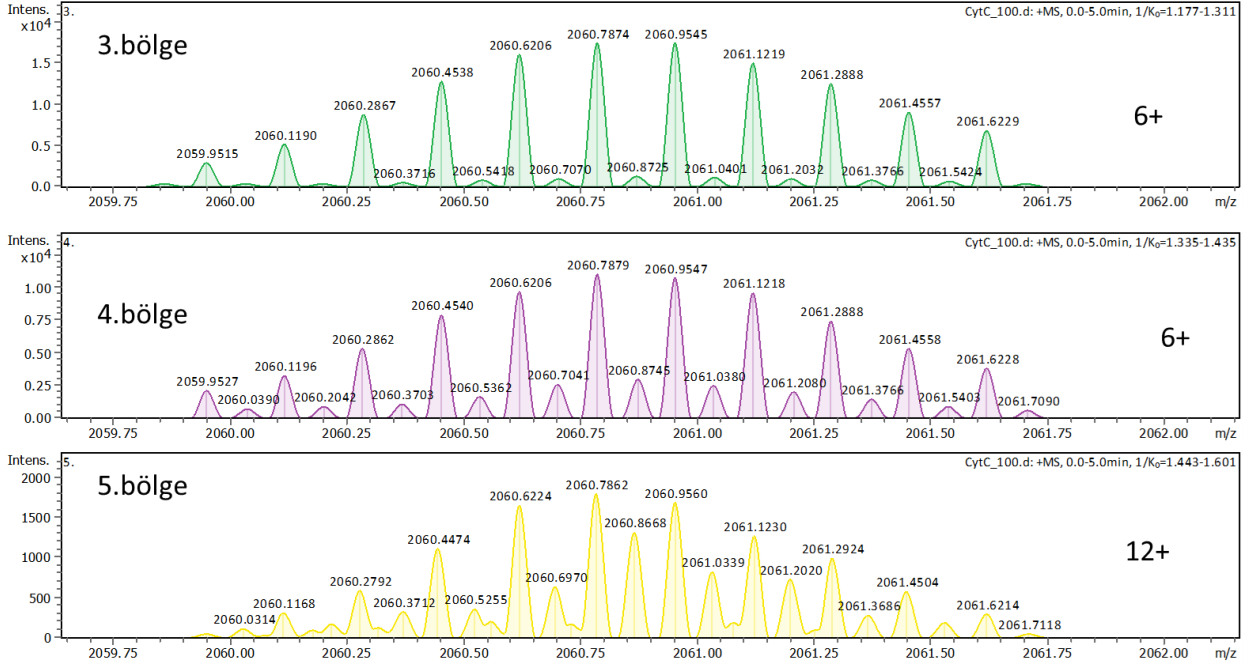
Şekil 2.11. Sitokrom c için iki boyutlu ısı haritası.

Sitokrom c ısı haritası üzerinden analit kütlelerinin hareketliliklerine bağlı olarak konformasyonel olarak ayrılırlar. İyon yoğunluğunun fazla veya az olduğu kısmın renkleri sağ tarafta bulunan yoğunluk çubuğu üzerinden değerlendirilebilir (Şekil 2.11.).



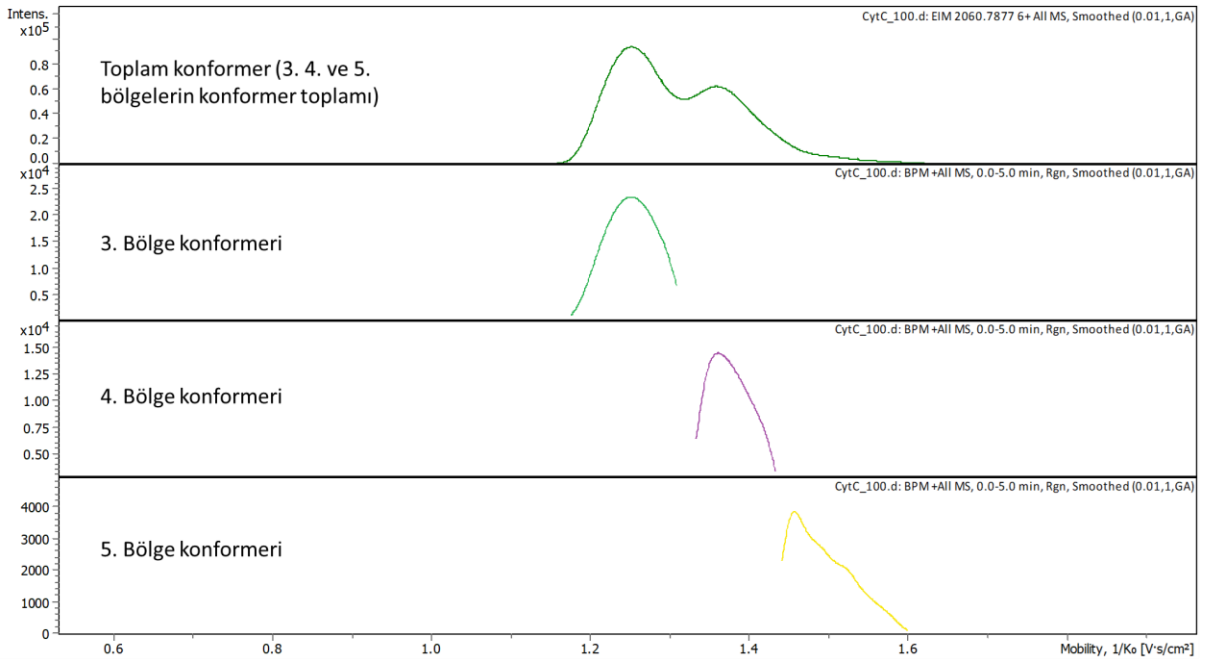
Şekil 2.12. Seçilen bölgelerin belirlenerek cytC 6+ yükü içerisinde karışan 12+ yüklü dimerin CCS bölgesinin belirlenmesi soldan itibaren bölge adları 3, 4 ve 5 aşağıdaki kısımda ise MS spektrumları gösterilmiştir.

Şekil 2.12.'de 6+ yüklü iyon seçilerek 3 farklı bölgeye ayrılabilir ve buradan kütleler içerisinde dimerin olup olmadığı belirlenebilir.



Şekil 2.13. Her bir bölgedeki ısı haritasına karşılık gelen kütle spektrumları.

Kütlelerin izotopik dağılımları sonucunda iki kütle arasındaki farktan yapının yükü belirlenebilir. Böylece aynı hareketlilik bölgesinde görülen multimerler birbirlerinden ayrılabilirler(Şekil 2.13.).



Şekil 2.14. Belirlenen bölgelerin hareketlilik spektrumlarının çıkarılması.

Sonrasında birbirlerinden ayrılmış kütle verileri üzerinden konformasyon bölgelerinin mobilite veya CCS cinsinden analizi yapılabilir (Şekil 2.14.).

2.6.2. Etkin Çarpışma Kesiti

İyon hareketliliği spektrometrisi analiz edilen moleküllerin konformasyonları ile ilgili detaylı veriler ortaya koyar. Etkin çarpışma kesiti (Collision Cross Section, CCS) molekülün uzaysal alanda kapladığı alan hakkında bilgi verir. Buna molekülün gaz fazındaki büyüklük parametresi de denilebilir. Sürükleyici gaz olan azot gazı ile örnek molekülünün çarpışması sonucu iyon hareketlilik spektrometrisi analizlerinden elde edilen sürüklenme zamanı verilerinden molekülün etkin çarpışma kesiti hesaplanabilir [95].

CCS değerlerinin hesaplanması deneysel çalışmalarda, Mason-Schamp eşitliğinden faydalanarak yapılır.

Bir iyonun hareketliliği (K), bir elektrik alanının etkisi altında (E) belirli sabit gaz tarafından iyonun sürüklenme hızı, (v_d) olarak tanımlanır.

$$v_d = KE. \quad (1)$$

Dolayısıyla K, iyonun sürüklenen gazla etkileşiminin bir fonksiyonudur. Bu etkileşim, gazın sıcaklığı, basıncı, bileşimi, polarize edilebilirliği ve iyonun yükü, şekli ve boyutu dahil olmak üzere çok sayıda değişkene bağlıdır. Hareketlilik tanımını basitleştirmek için, K'yi standart sıcaklık (T_0) ve basınç (P_0) şartlarına göre standartlaştıran, bir hareketlilik tanımını olarak K_0 kullanılabilir:

$$K_0 = K \frac{T_0}{T} \frac{P}{P_0}. \quad (2)$$

Burada, T ve P sırasıyla sıcaklık ve basınçtır. K_0 değerli bir bilgi parçası olarak sadece IMS sistemlerinde kütüphanelerden alınan bilgilerle tanımlamalar yapılabilir. Ancak IMS sistemler MS ile birleştirildiğinde MS'den gelen kütle/yük (m/z) bilgisi sayesinde ve IMS sisteminden gelen K_0 bilgisi ile birlikte Mason Schamp eşitliği üzerinden CCS hesaplaması yapılabilir.

$$CCS = \frac{3ze}{16N} \frac{1}{K} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_b T}} \quad (3)$$

Burada z iyon üzerindeki yüküdür, e temel yüküdür. k_b Boltzman sabiti ve μ indirgenmiş küttedir. Denklemden K yerine K_0 koyulması durumu, (3) N sayı yoğunluğu terimine olan ihtiyacı ortadan kaldırır:

$$CCS = \frac{3ze}{16} \frac{1}{K_0} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_b T}} \quad (4)$$

Denklemin içerisindeki (4) sabitlerin hesaplanması sonucunda (5);

$$CCS = 18500 \frac{z}{K_0} \sqrt{T \frac{Mm}{M+m}} \quad (5)$$

Deneyel olarak CCS değerlerinin bulunması için MS analizleri ile elde edilen iyon yükü ve kütleleri değerleri tanımlanır. Diğer bilinmeyen K değeri, molekülün dedektöre ulaşım süreleri üzerinden hesaplanmaktadır.

Teorik CCS hesaplamaları için kullanılan formüller deneyel formüllerden farklıdır. Molekülün teorik CCS değerinin hesaplanmasında birçok program kullanılabilir. Literatürde bu hesaplamalarla ilgili olarak en çok karşılaşılan programlar MOBCal-MPI [96] (MOBCAL [97]'in gelişmiş versiyonudur. Çoklu çekirdek kullanabilme kapasitesine sahiptir.), Collidoscope [98] ve IMOS [1]'dir. Bu tez çalışması kapsamında IMOS programı kullanılmıştır.

“IMOS” adındaki program Carlos Larriba tarafından geliştirilmiştir. Programın CCS hesaplamaları için genel olarak kullanılan teknikler, projeksiyon yaklaşımı (PA), sert küre saçılması (EHSS) ve yörünge metodu Lennard Jones (TMLJ) olarak üçe ayrılır.

Bu yaklaşımlardan TMLJ tekniği doğruluk açısından altın standart olup uzun-menzilli potansiyeller ve sürüklenme için kullanılan gaz ile etkileşimleri de hesaplamaya dahil eder.

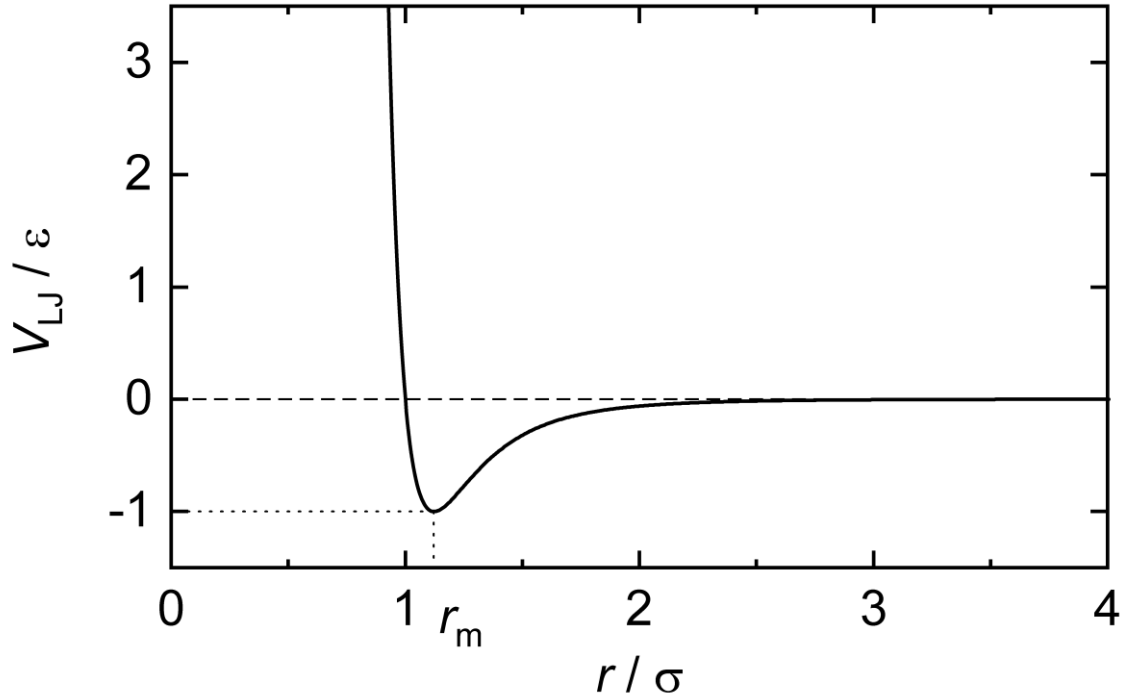
EHSS modeli ise molekül iyonunun içerisindeki atomların sert küreler [99] olduğunu varsayar. Gelen sürükleyici gazın moleküle çarptıktan sonra sahip olduğu saçılma açılarının ortalamasına göre hesaplama yapar. EHSS modeli, sürükleyici gaz ve iyon

arasındaki uzun-menzilli potansiyelleri yok sayar, sadece saçılma açılarına göre hesaplamaları yapar.

PA hesaplamaları, çok hızlı bir teknik olup gaz ve iyon arasındaki uzun-menzilli potansiyelleri ve saçılmayı yok sayar. Birçok sürükleyici gaz molekülünü molekül üzerine farklı açılardan göndererek projeksiyon önüne düşen bir gölge gibi hesaplama yapar.

2.6.2.1. Lennard-Jones Potansiyeli

Lennard-Jones potansiyeli, moleküller arası etkileşimlerin elektronik olarak nötral atom veya molekülleri tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmakta olan basit ancak gerçekçi bir modeldir. Bu denklem adını Sir Lennard John Edward Jones'dan almıştır [100, 101].



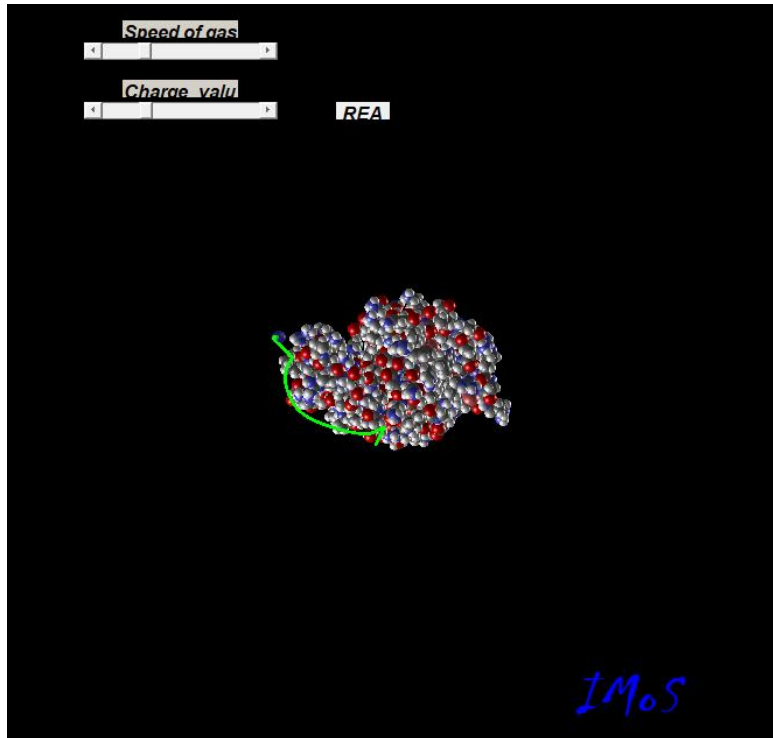
Şekil 2.15. Lennard-Jones Potansiyel fonksiyonunun grafiği [102].

$$V_{LJ}(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

Yukarıdaki formülde yer alan r değeri iki parçacığın etkileşimi, ϵ potansiyel kuyu derinliği σ iki parçacık arasındaki potansiyelin sıfır olduğu uzaklık, Lennard-Jones potansiyelinin minimumu $r = r_m = 2^{1/6} \sigma$ olduğunda $V = -\epsilon$ değerini alır [100, 101].

$$\Phi(x, y, z) = 4\epsilon \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{\sigma}{r_i} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_i} \right)^6 \right] - \frac{\alpha}{2} \left(\frac{ze}{n} \right)^2 \left[\left(\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{r_i^3} \right)^2 + \left(\sum_{i=1}^n \frac{y_i}{r_i^3} \right)^2 + \left(\sum_{i=1}^n \frac{z_i}{r_i^3} \right)^2 \right] \quad [97]$$

IMOS programı hesaplamalarında LJ 4-6-12 potansiyelini kullanmaktadır. Yukarıdaki denklemde $r_i=(x_i,y_i,z_i)$ n atomlarının (veya yüklerinin) her biri ile gaz molekülü arasındaki göreceli mesafedir. α , tampon gazının polarize edilebilirliğidir ve ϵ ve σ , sırasıyla potansiyel kuyu derinliği ve sıfır potansiyel geçişe karşılık gelen Lennard-Jones(L-J) gaz-atomu parametreleridir. Yukarıda bahsedilen potansiyel daha sonra gaz molekülünün ivmesini ve gaz molekülü alandan ayrılana kadar yörüngesini hesaplamak için kullanılır ve her bir gaz molekülü için kaydedilen sapma açısı da hesaplanır [103].



Şekil 2.16. IMOS programında TMLJ azot molekül hareketinin görsel bir kesiti.

1AKI pdb kodlu lizozim için, IMOS TMLJ yöntemi ile yapılan CCS hesaplamasının görsel bir kesiti gösterilmiştir (Şekil 2.16.). Yeşil çizgi azot molekülünün protein yüzeyine çarpması ve üzerinde gezmesi sonucu protein boyutunu CCS cinsinden hesaplamaktadır. Bu işlem birçok azot molekülü ile farklı yönlerden birçok kez sırayla yapılarak protein yüzeyinin ortalama bir CCS değerini çıkarmaktadır.

Teorik CCS hesaplamaları için IMOS [1] programında TMLJ yöntemi kullanılmaktadır.

2.6.2.2. Eylemsizlik Yarıçapı (R_g)

R_g , toplam sistemin denge konformasyonunu tanımlayan bir parametredir ve iki adımda hesaplanır. İlk olarak, aşağıdaki denklemdeki hidrojen atomları göz ardı edilerek kütle merkezinin R_C koordinatları belirlenir.

$$\sum m_i(r_i - R_C) = 0, \quad (1)$$

m_i , i atomunun kütlesi ve r_i i atomunun koordinatlarıdır. Atomlar üç boyutlu düzlemde bir nokta olarak varsayılırsa eylemsizlik yarıçapı aşağıdaki denklem ile elde edilir.

$$R_g^2 = \sum m_i(r_i - R_C)^2 / M, \quad (2)$$

M proteindeki atomların kütlelerini temsil eder. Proteinler için hidrojen hariç atomlar için kütle eşitliği;

$$R_g^2 \cong \sum_{i=1}^N (r_i - R_C)^2 / N, \quad (3)$$

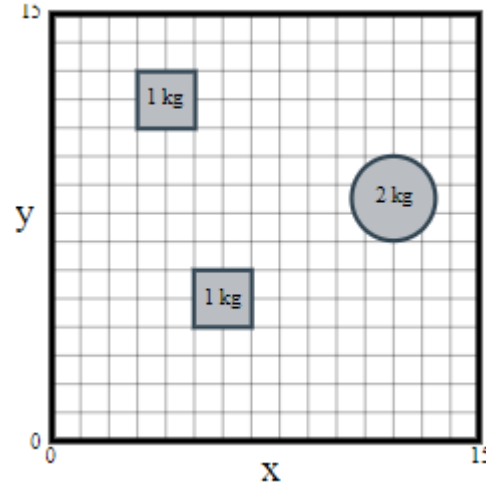
N protein içerisinde hidrojen hariç tüm atomların sayısıdır.

Doğruluk bakımından atomları nokta yerine R yarıçaplı küre olarak düşünmemiz gerekmektedir.

$$R_g^2 = \sum_{i=1}^N (r_i - R_C)^2 / N + \frac{3}{5}R^2. \quad (4)$$

Denklemden (4), $3/5R^2$ kürenin eylemsizlik yarıçapının karesi ve değişmeyen yoğunluğudur:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^R r^2 4\pi r^2 dr}{\int_0^R 4\pi r^2 dr} = \frac{3}{5}R^2. \quad (5)$$



Şekil 2.17. R_g hesaplamaları temelinde atomların kütle merkezindeki konumlarına dayanır [104].

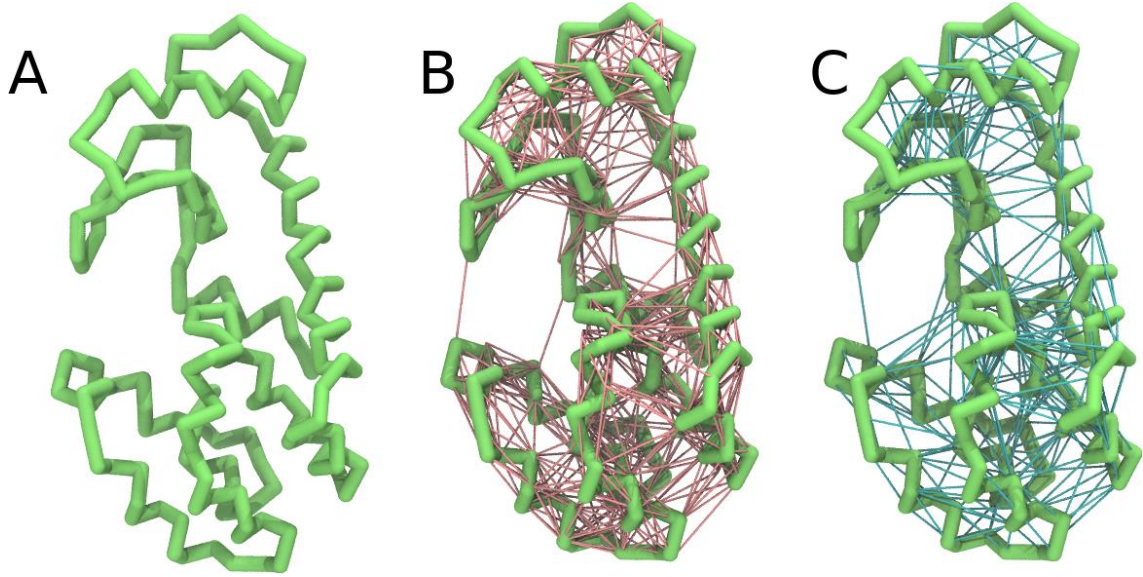
Protein üzerindeki küresel atomların kütleleri ne kadar birbirlerine yaklaşırsa R_g değeri o kadar düşer ve bu durum kompaktlığın göstergesi olarak bilinmektedir [105]. R_g değerlerinin aynı protein için kıyaslanması gerekir. Bu yüzden R_g değeri lizozim ve cytC gibi farklı proteinlerin kompaktlığını kıyaslamaktan ziyade, sadece o proteinin farklı ortamlardaki veya etkileşimleri sonucu R_g değişimi üzerinden kompaktlaşması hakkında bilgi verir.

2.7. Martini+Gö-like CG modeli ve Martini3 FF

Martini3 FF [106] ile CG modelleme lego blokları gibi düşünülebilir. Bütün atom (All Atom, AA) modelleri üzerinden gelen bilgiler ile en fazla 4 atomu 1 taneciğe çevrilebilmektedir. Bu durum daha hızlı simülasyon sürelerini sağlamaktadır.

AA ve kuantum moleküler dinamik teknikler, yüksek hesaplama gücüne ihtiyaç duyarlar. Kompleks ve çok fazla atomun bulunduğu modellemelerde milisaniye türevinde simülasyonlar için gelişmiş süper bilgisayarlar gereklidir. AA kullanılarak yapılan simülasyonlar kişisel bilgisayarlarda nanosaniye/gün mertebesindedir. Ancak CG tekniği ile bu durum mikrosaniye/gün şeklinde uygulanabilmektedir. Süper bilgisayarlarda ms mertebelerinde simülasyonlar çok kısa sürelerde yapılabilir (modelin büyüklüğüne bağlı olarak). Bu hızın ve birçok atomun tek bir taneciğe çevrilmesi, proteinin ikincil yapıları gibi detaylı bilgilerin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Ancak CG modelleme ile proteinin üçüncül yapılarındaki değişimleri açıklığa kavuşturulabilir. IM-MS

sistemlerinde CCS değerleri, proteinin üçüncül yapısındaki değişim üzerinden değerlendirilir ve cihaz içerisinde proteinlerin dedektöre ulaşma süreci ms mertebesindedir. CG modelleme diğer modellemelere göre daha hızlı simülasyon süreleri, çok atomlu büyük kompleks simülasyon sistemlerinde çalışılabilmesi, üçüncül yapılar hakkında bilgi verebilmesi ile IM-MS çalışmalarına uygun bir modelleme tekniği olduğu söylenebilir.



Şekil 2.18. Martini CG tekniğindeki modeller listelenmiştir [107]. Protein bağlarının yapılmadığı model **A**, Elastik ağ modeli **B** ve Martini Gō-modeli **C**.

Yukarıdaki şekilde kullanılan martini modeli etkileşimlerden daha kolay etkilenen Gō-Martini [108] modelidir. (Daha az iç ağ yapısı bulunan model türüdür.)

Diğer iki modelde ise A modeli uygulanamamıştır. B modeli (elastik ağ) ise çok daha bütün halde ve bozunmaz yapıda olduğundan dolayı tercih edilmemiştir.

Protein konformasyon çalışmaları nörodejeneratif hastalıklarla mücadelede, protein-ligand etkileşim çalışmalarında ve protein dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasında önemli bir role sahiptir. Literatürde yapılan IM-MS konformasyon analiz deneylerinin spekülatif olarak yorumlanması ve teorik olarak desteklenmemesi protein dinamiklerinin nasıl çalıştığını anlamamız için yeterli değildir. Bu yüzden dolayı yapılan çalışmaların olabildiğince teorik olarak da desteklenmesi çalışmanın özgünlüğü için önem taşımaktadır. Bu çalışmada literatürdeki birçok çalışmadan farklı olarak deneysel veriler

moleküler dinamik simülasyonları kullanılarak hızlı bir yaklaşım olan CG tekniği ile PSS-protein kompleksleşmesinin protein yapısını kompaktlaştırdığı hakkında veriler elde edilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Cihazın kütle ve iyon hareketliliği kalibrasyonu için gerekli çözelti Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) tarafından temin edilmiştir.

Deneyde Sigma-Aldrich'den alınan at kalbinden üretilen ≈ 12360 Da kütlede izoelektrik noktası $pI=10-10.5$ olan sitokrom c [109] ve tavuk yumurtasının beyazından üretilen ≈ 14310 Da kütleli izoelektrik noktası $pI=11.35$ olan lizozim [110] proteinleri kullanılmıştır.

Su, metanol (MeOH), asetonitril (ACN), amonyum asetat (AAc), Sigma Aldrich (St Louis, MO, ABD) firmasından satın alınmıştır. Deneylerde Sigma-Aldrich'ten alınan su LC-MS seviyesinde saflıktadır.

Sitokrom c proteininin pH ayarlamaları 10 mM AAc içerisinde pH metre kullanılarak, asitli ortam için HCl, bazik ortam için ise NaOH kullanılarak $pH=3.1, 4.1, 9, 10.2$ çözelti ortamları hazırlanmıştır. Sadece bu deney için su olarak MQ-Su kullanılmıştır.

Polielektrolit-Protein

10 μM derişiminde lizozim ve cytC protein çözeltileri hazırlanıp 60 μM derişimindeki Polistren sülfonat (PSS) $M_w \approx 1100$ Da çözeltilisi ile karıştırılarak 10-25-50 mM derişimindeki AAc çözeltilisi içerisinde analizler yapılmıştır. Sodyum tuzlu PSS polimeri, Polymer Standards Service-USA (Warwick, RI) firmasından temin edilmiştir.

3.2. İyon Hareketliliği - Kütle Spektrometrisi (IM – MS) Analizleri

Protein konformasyon analizleri, elektrosprey iyon kaynağı bulunduran ve iyon tuzaklama prensibine göre çalışan TIMS-TOF-MS (Trapped Ion Mobility Spectrometry - Time of Flight - Mass Spectrometry, Bruker Daltonics, Germany) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analizlerde sürükleyici gaz olarak yüksek saflıkta azot gazı kullanılmıştır. Analiz edilen protein çözeltileri 10µM derişiminde hazırlanmıştır. Analizlerde çözücü olarak su ile 10-25-50mM derişiminde amonyum asetat (AAc) çözeltisi hazırlanarak farklı iyon şiddetlerindeki etkiler analiz edilmiştir. Oda sıcaklığında hazırlanan çözeltiler, TIMS- TOF-MS cihazına 3.0 µL/dk akış hızıyla direkt infüzyon tekniği kullanılarak gönderilmiş ve veriler 5 dakika boyunca kaydedilmiştir. Yapılan analizlerin öncesinde günlük olarak standart referans maddeler kullanılarak kütle ve iyon hareketliliği kalibrasyonları yapılmıştır. Veri analizleri, Bruker Daltonics tarafından sağlanan Data Analysis 5.1 programıyla yapılmıştır.

Cihaz Parametreleri

EndPlate Offset = 500V

Capillary = 3000V

Nebulizer 0.5 Bar

Dry Gas = 4.0 L/dk

Dry Temp = 100 ve 150°C (10'ar °C farklarla) aralığında değiştirilerek analizler yapılmıştır.

Tuzaklamalı bölge için Δ potansiyel farkı değerleri;

$\Delta 1 = -20V$ | $\Delta 2 = -120V$ | $\Delta 3 = 120V$ | $\Delta 4 = 120V$ | $\Delta 5 = 0V$ | $\Delta 6 = 120V$

Yapılan deneyler aksi belirtilmedikçe iyon kaynağı sıcaklığı 100 °C ve 3.0 kV kapiler voltaj değerlerinde gerçekleştirilmiştir.

3.3. Teorik Çalışmalar

CytC(1HRC) ve lizozim(1AKI) X-ışını pdb dosyalarına CHARMM-GUI [111] kullanılarak hidrojenler eklenmiş ve IMOS (versiyon 1.10c) programı ile moleküler dinamik simülasyonları yapılmadan CCS hesaplamaları yapılmıştır. Bu tarz doğrudan simülasyonsuz (benzetimsiz) teorik CCS hesaplamaları kıyaslamalar için literatürde yer almaktadır [112, 113].

PSS-lizozim etkileşimi çalışmalarında; CG teknik ile simülasyonlar, hem çözelti hem gaz fazında Windows 10 için Cmake ve Visual Studio kullanılarak derlenen OpenCL [114] tabanlı GROMACS [115]-2021.5 [116] kullanılarak 3400G AMD CPU ve $\approx 1,97$ Tflops (FP32) hızındaki AMD [117] RX Vega 11 GPU ile yapılmıştır. Gaz fazı yüklerinin belirlenmesi aşamasında Collidoscope programından faydalanılmıştır.

1AKI pdb lizozime ait dosya, dssp [118] ve vermouth-martimize programı ile bütün atomdan CG martini+gö-like [119] modeline çevrilmiştir. “Polyply [120] python suite” kullanılarak PSS .itp dosyaları ve simülasyon sisteminde koordinasyonları üretilmiştir. Çözelti ve gaz fazı çalışmaları için Gromacs-2021.5 kullanılmıştır. Çözelti fazında su molekülleri simülasyon sistemine eklenerek protein su içerisinde çözülmüştür. Net yükün sıfır “0” olması için 0.01 M derişiminde NaCl tuzu eklenmiştir. Enerji minimizasyonu ve 1ns NPT dengeleme sonrasında NPT simülasyonları 300K sıcaklıkta 20 femtosaniye (fs) adımlarla 100 nanosaniye (ns) kadar simüle edilmiştir.

Çözelti ve gaz fazında protein üzerindeki yüklenmeler farklıdır. Bu yüzden gaz fazındaki yüklenmeler için Collidoscope [98] yük durumu algoritmasından faydalanılmıştır. Lizozim CG tanecikleri yan zincirlerinden [121] yüklenmiştir. PSS5’in takıldığı protein 12+, PSS4’ün takıldığı protein 11+ ve son olarak PSS3’ün takıldığı protein 10+ yüklenerek gaz fazında net yük dengesi 7+ olan iyon oluşturulmuştur. Gaz fazında simülasyonların daha hızlı ilerlemesi için “Pseudo-PBC” [122] adında bir teknikten faydalanılmıştır. Çözelti fazında kenetlenmiş PSS5-protein kompleksinden su ve iyonları silinerek ≈ 999 nm kenarlara sahip kübik kutunun ortasına yerleştirilmiştir. Enerji minimizasyonundan sonra 373K sıcaklıkta NVT 20fs adımlarla 100ns kadar simüle edilmiştir (vakum ortamdan dolayı örnek martini dosyalarındaki epsilon_r değeri 1

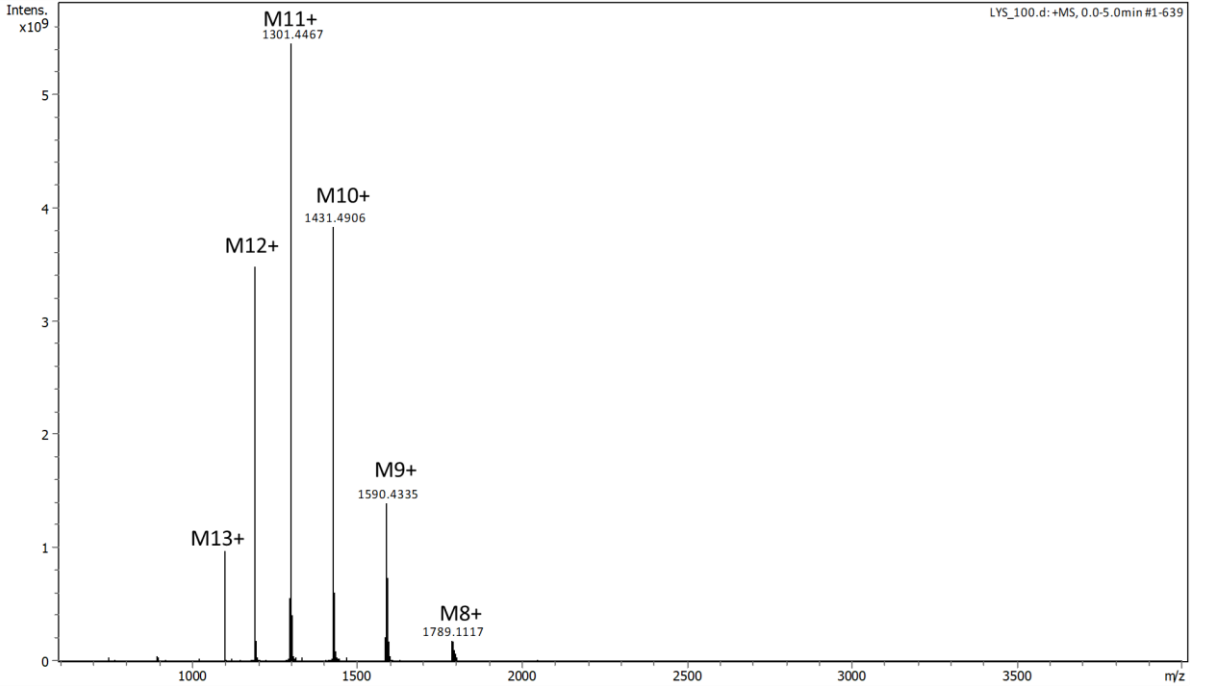
yapılmıştır). Aynı işlem vakumda PSS üzerinden birer monomer çıkarılarak PSS3 ve PSS4 için tekrarlanmıştır.

Ortaya çıkan teorik sonuçların deneysel verilerle uyumluluğu karşılaştırılmıştır. PSS-protein etkileşimlerinde PSS bağlanması sonucunda protein yapısının kapanması, artan kompaktlığın göstergesi olan R_g değerinin azalması üzerinden değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

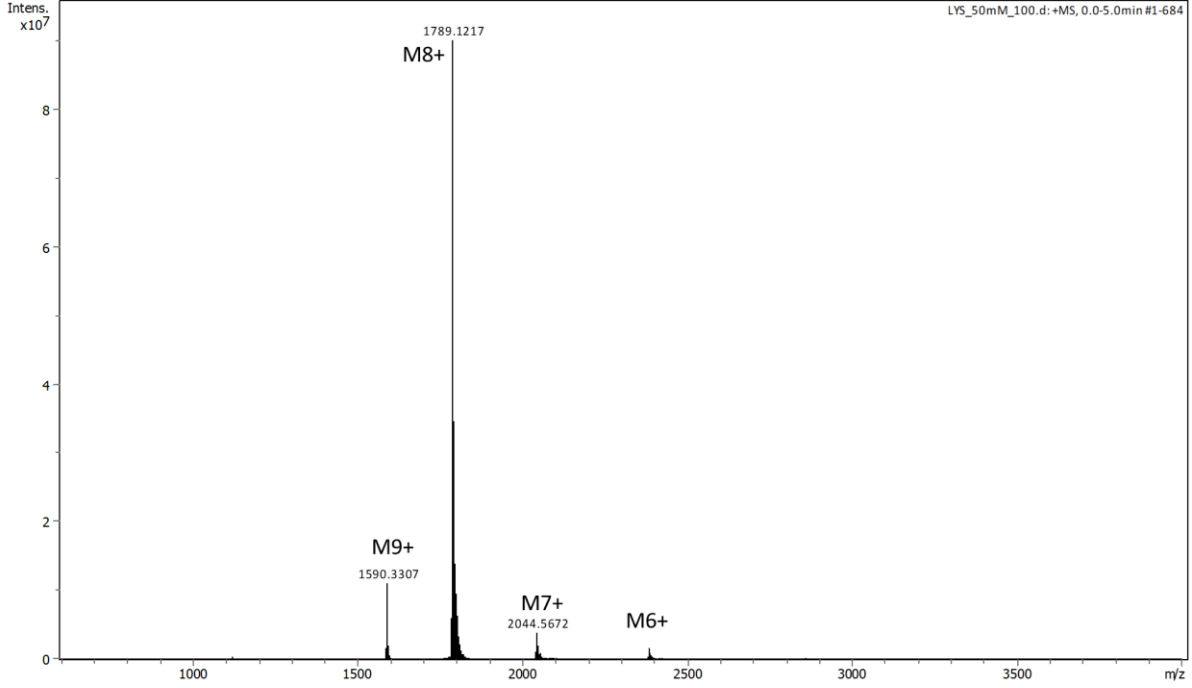
Lizozim ve sitokrom c (cytC), benzer boyut ve net yüke sahip küçük, temel küresel proteinlerdir. Her iki protein de hemen hemen aynı kütle ve pI değerlerine sahiptir. Bu proteinlerin en büyük farkı lizozimin kovalent disülfid bağlarına sahip olmasından kaynaklı sitokrom c ye göre yapısı daha bütünlük halindedir. Bu yüzden bu iki protein genelde model proteinler olarak sıklıkta çalışılmaktadır.

4.1. Proteinlerin farklı çözelti ortamlarındaki TIMS-TOF-MS analizleri



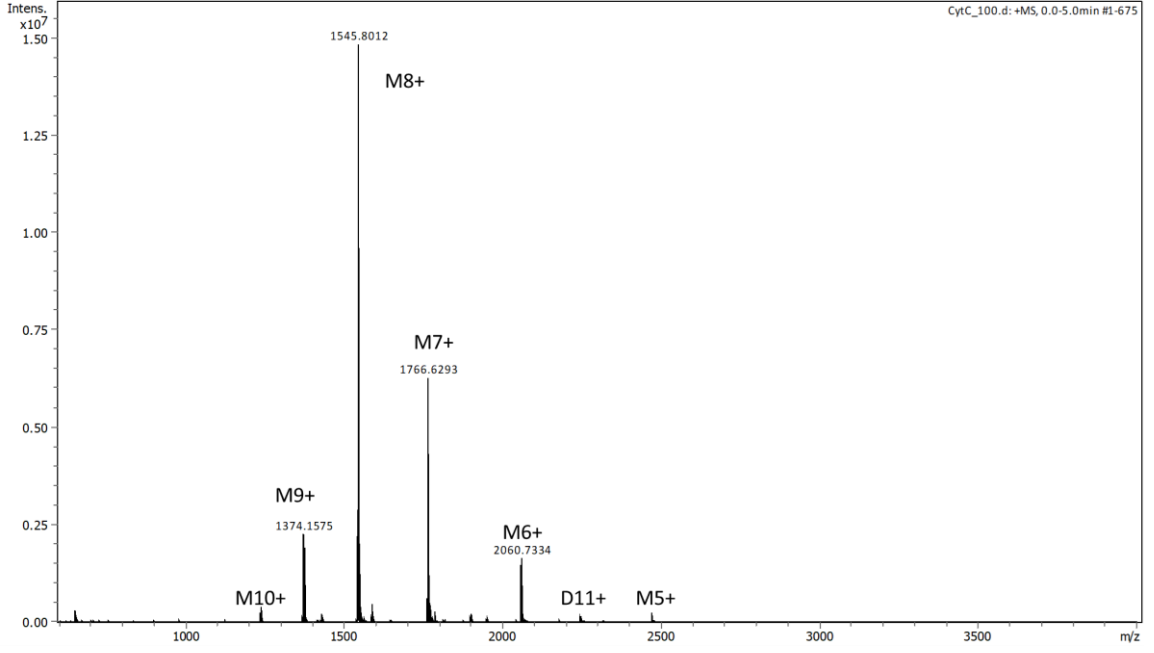
Şekil 4.1. Su çözeltisi içerisindeki lizozim proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.

Lizozim su içerisinde pH=6.7 civarında olmasına rağmen gaz fazına geçtiğinde protonlanma sonucu daha asidik olduğundan dolayı yüksek yükler gözlemlenmiştir.

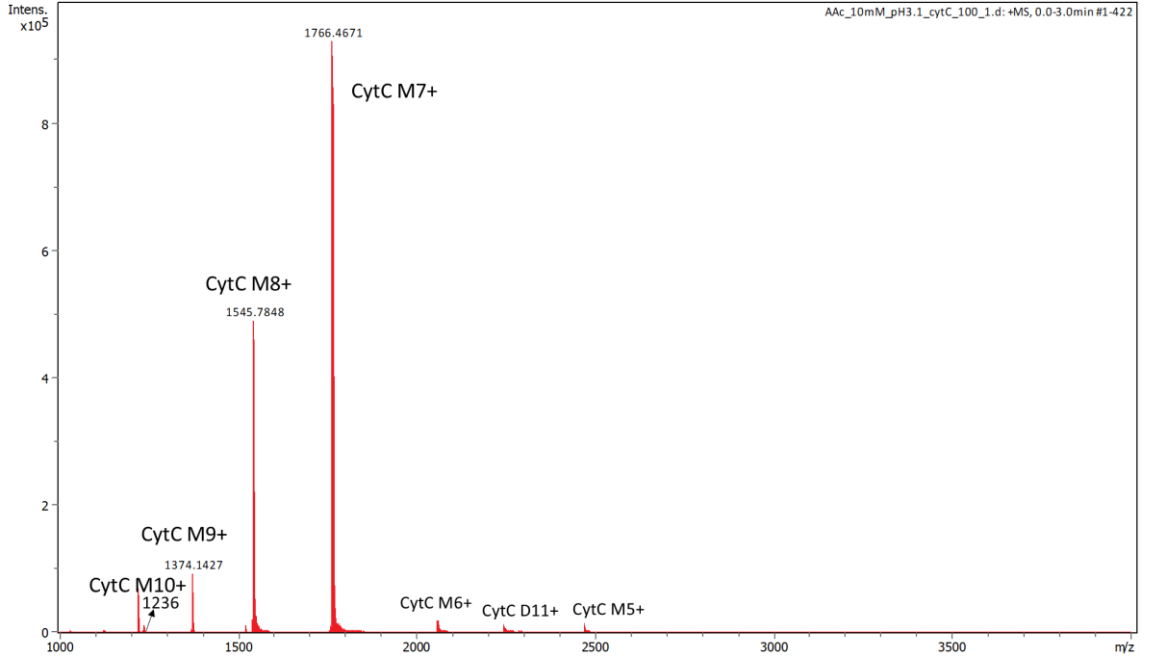


Şekil 4.2. 50mM AAc çözeltisi içerisindeki lizozim proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.

Lizozim amonyum asetatın 50 mM derişimi içerisinde çözelti fazında pH değeri nötral pH ya yakın olmasına rağmen daha düşük yüklere sahiptir. Amonyum asetatın burada gaz fazında pH değerinin çok fazla aşağıya çekilmesini engelleyerek bir nevi tampon görevi sağlamış olduğu görülmektedir (Şekil 4.2.) [70].

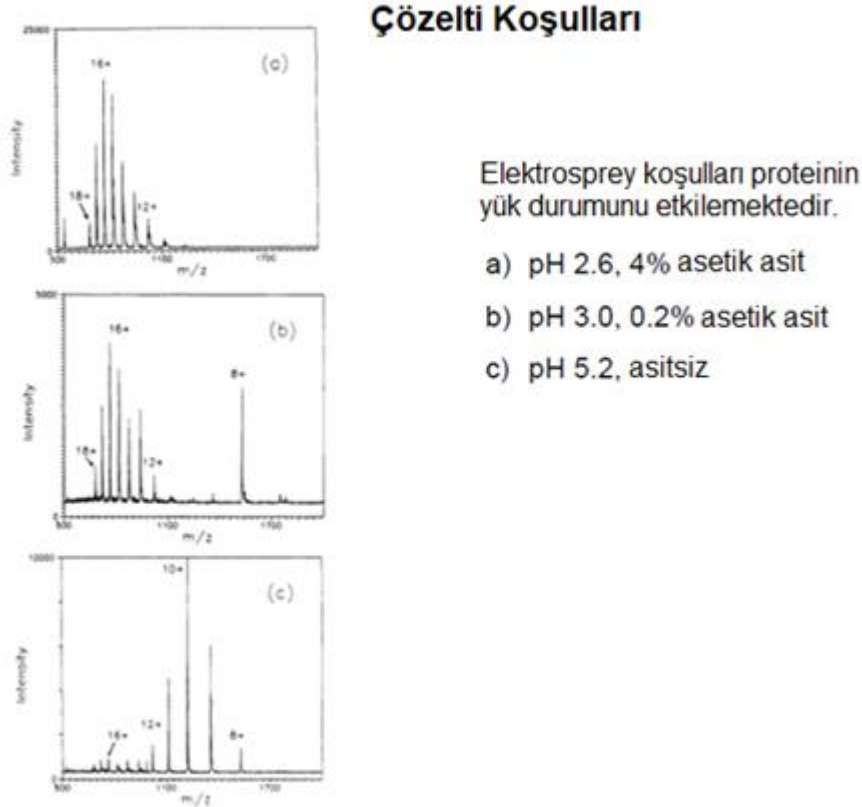


Şekil 4.3. Su çözeltisi içerisindeki sitokrom c proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.



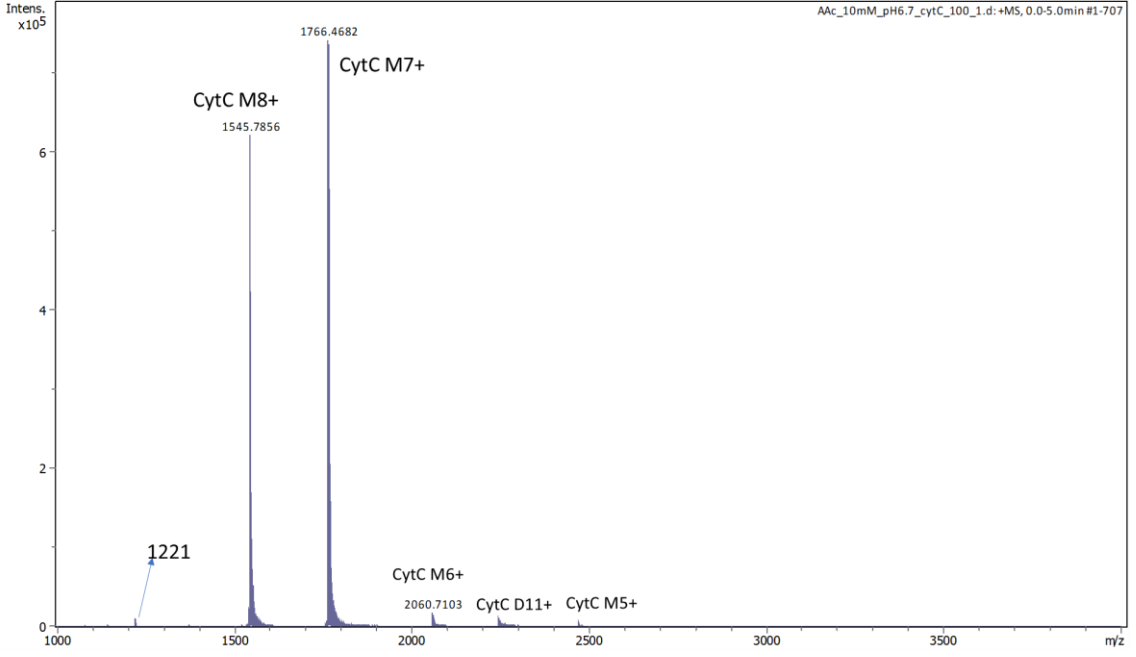
Şekil 4.4. 10 mM AAc çözeltisi (pH=3.1) içerisindeki sitokrom c proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.

Sitokrom c proteini, asidik ortamda (pH=3.1) yüksek yüklere sahiptir. Her ne kadar asidik ortamda proteinin yapısının açılacağı düşünülse de proteinin bir kısmı halen yapısını koruduğu için daha düşük değerlerdeki yükleri görmek de mümkündür.



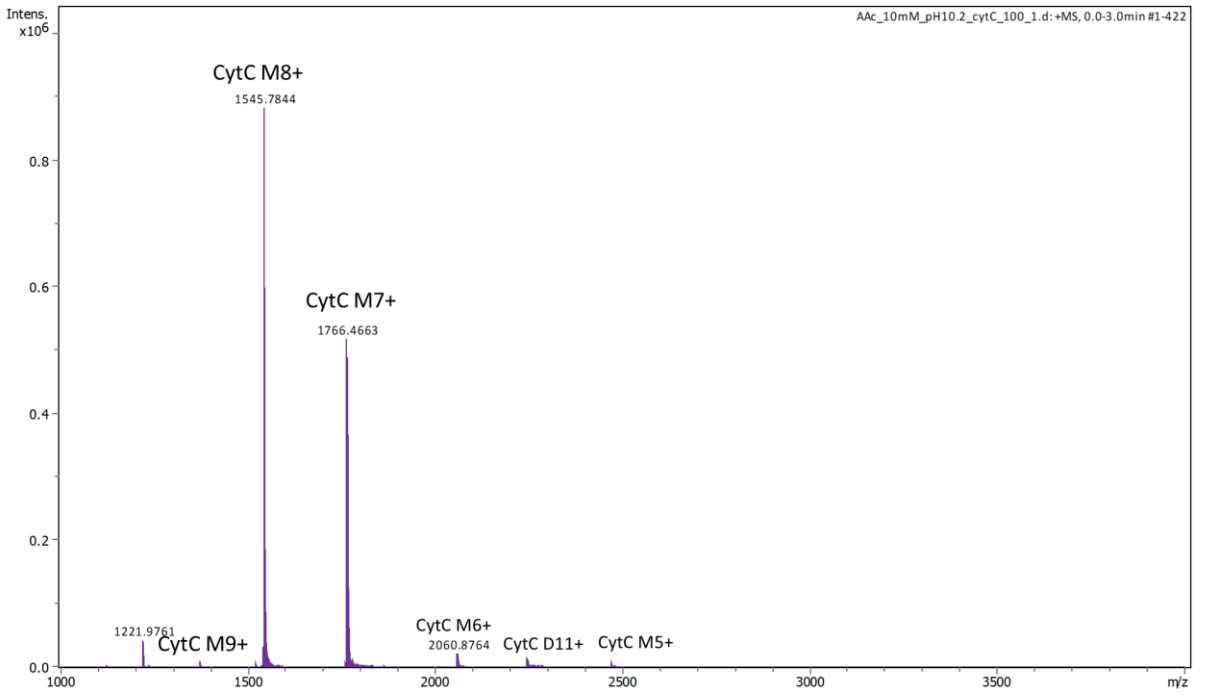
Şekil 4.5. Farklı çözelti ortamlarından asetik asitin sitokrom c proteinin yüklenmesine etkisi [123].

Yukarıdaki şekilde AAc olmaması durumunda kütle spektrumunda yüksek yüklere sahip iyonlara ait sinyallerin daha yoğun olduğu görülmektedir. Şekil 4.4. pH değeri ve şekil 4.5. deki %0.2 asetik asit çözeltisinin pH değerleri birbirlerine yakın olmasına rağmen gaz fazında pH değerleri Şekil 4.5. de daha fazla düşmektedir. AAc ise buna engel olduğundan kütle spektrumunda çok yüksek yüklere ait sinyaller görülemediği.



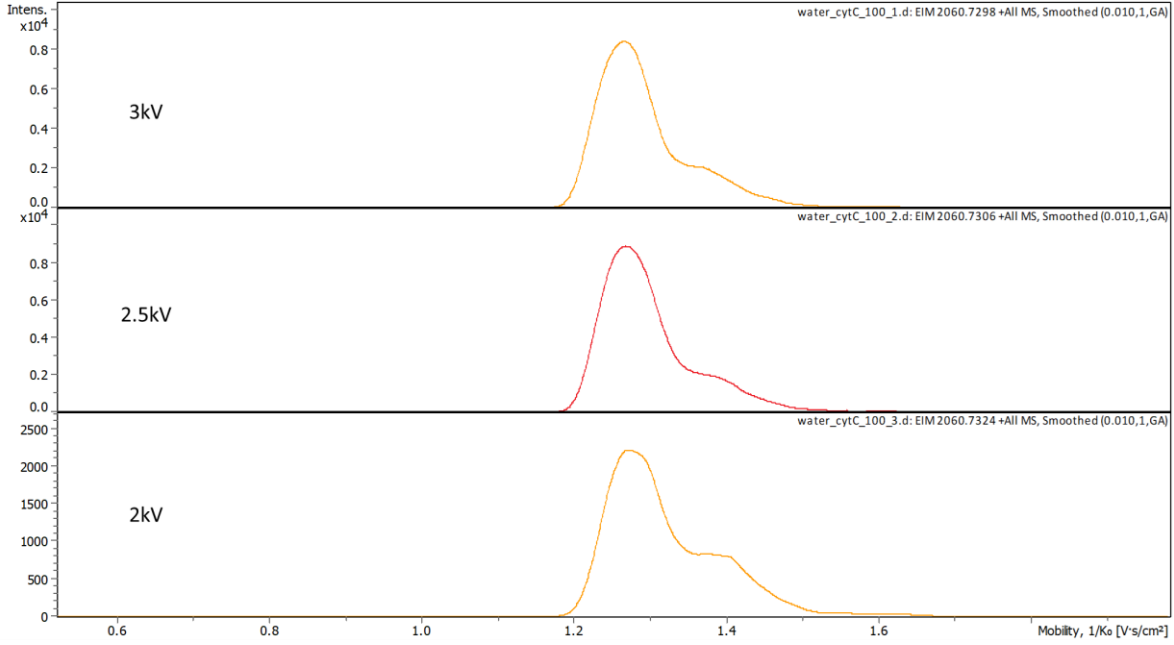
Şekil 4.6. 10 mM AAc çözeltisi (pH=6.7) içerisindeki sitokrom c proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.

Şekil 4.6.'de görüldüğü üzere, sitokrom c proteini, nötrale yakın pH değerlerinde (pH=6.7) daha az yüklenmiştir.



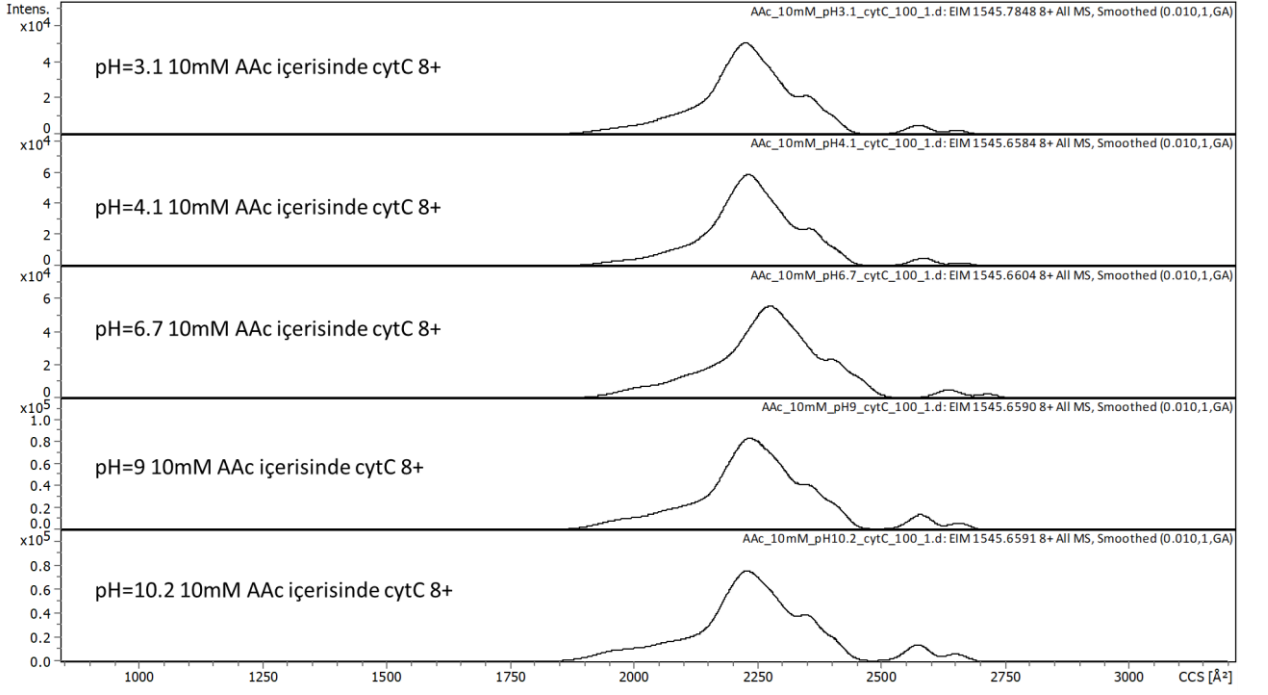
Şekil 4.7. 10 mM AAc çözeltisi (pH=10.2) içerisindeki sitokrom c proteininin analizden elde edilen kütle spektrumu.

Sitokrom c proteininin bazik ortamda (pH=10.2) hazırlanan çözeltisi kullanılarak yapılan ESI-MS analizinden elde edilen kütle spektrumunda (Şekil 4.7.) daha yüksek yük değerlerine sahip iyonlara karşılık gelen sinyaller gözlenmiştir.



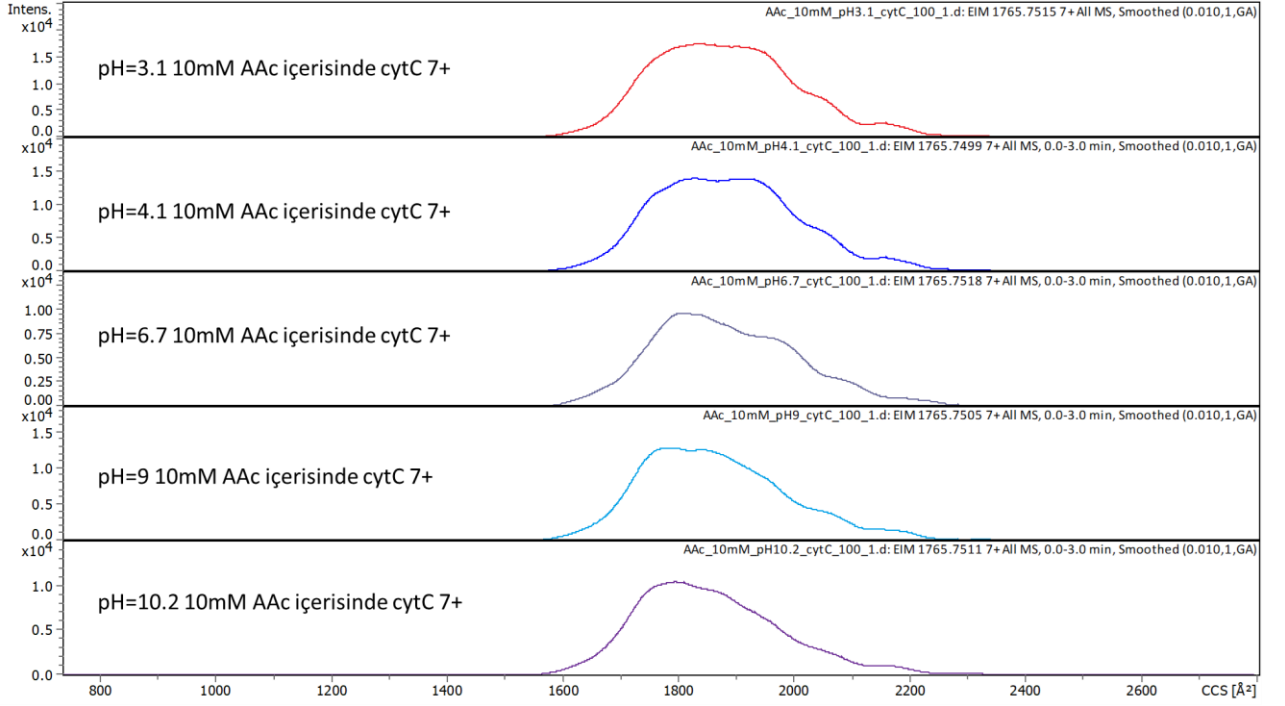
Şekil 4.8. Sitokrom c proteininin iyon kaynağı sıcaklığı 100 °C ve farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 6+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.

Şekil 4.8.'de voltaj değişiminin sinyal şiddetini etkilediği ancak, proteinin CCS değerleri üzerindeki etkisinin çok az olduğu görülmektedir. Bu nedenle, daha yumuşak iyonlaştırma koşullarında ve yüksek iyon şiddetinde verilerin edilebilmesi amacıyla, tez kapsamındaki TIMS-TOF-MS analizlerinde kapiler voltajı değeri, 3.0 kV olarak belirlenmiştir.



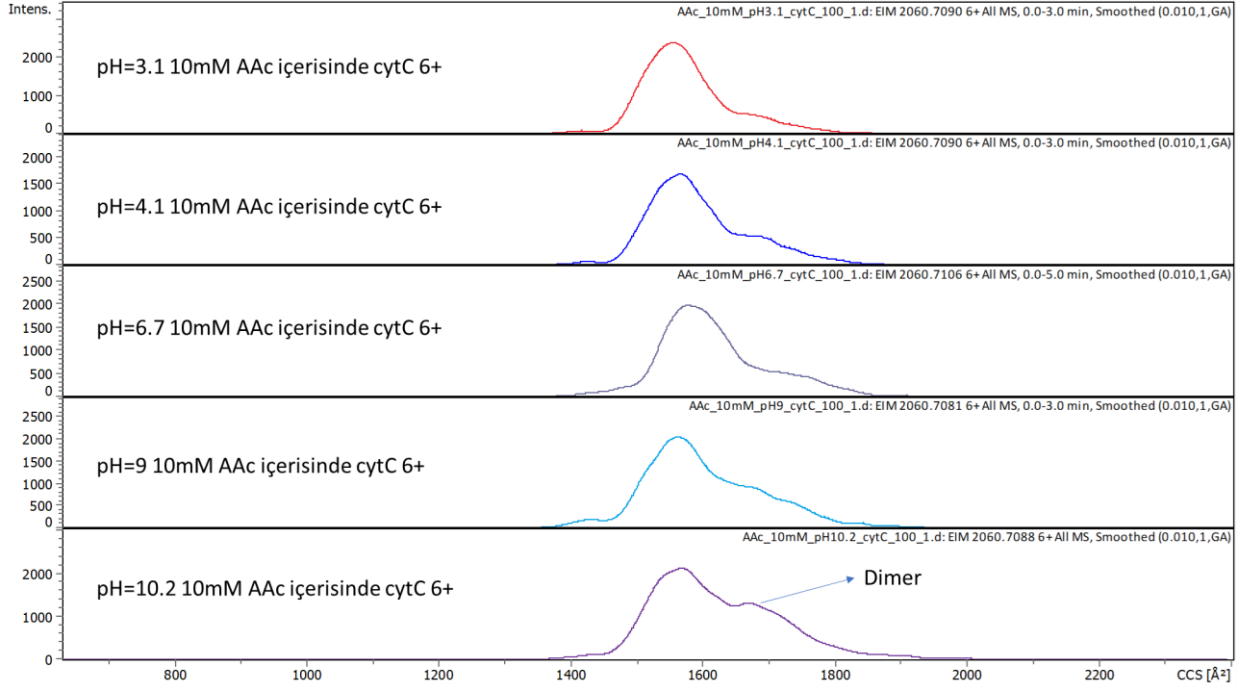
Şekil 4.9. 10 mM AAC çözeltisi içerisinde hazırlanan ve farklı pH koşullarındaki sitokrom c proteininin TMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 8+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.

Şekil 4.9.'da verilen mobilogramlar değerlendirildiğinde, sitokrom c proteinin içerisinde hazırlandığı çözeltinin pH değerindeki değişimin proteininin 8+ yüklü monomer iyonunun CCS değerleri üzerindeki etkisinin düşük olduğu görülmektedir [124].



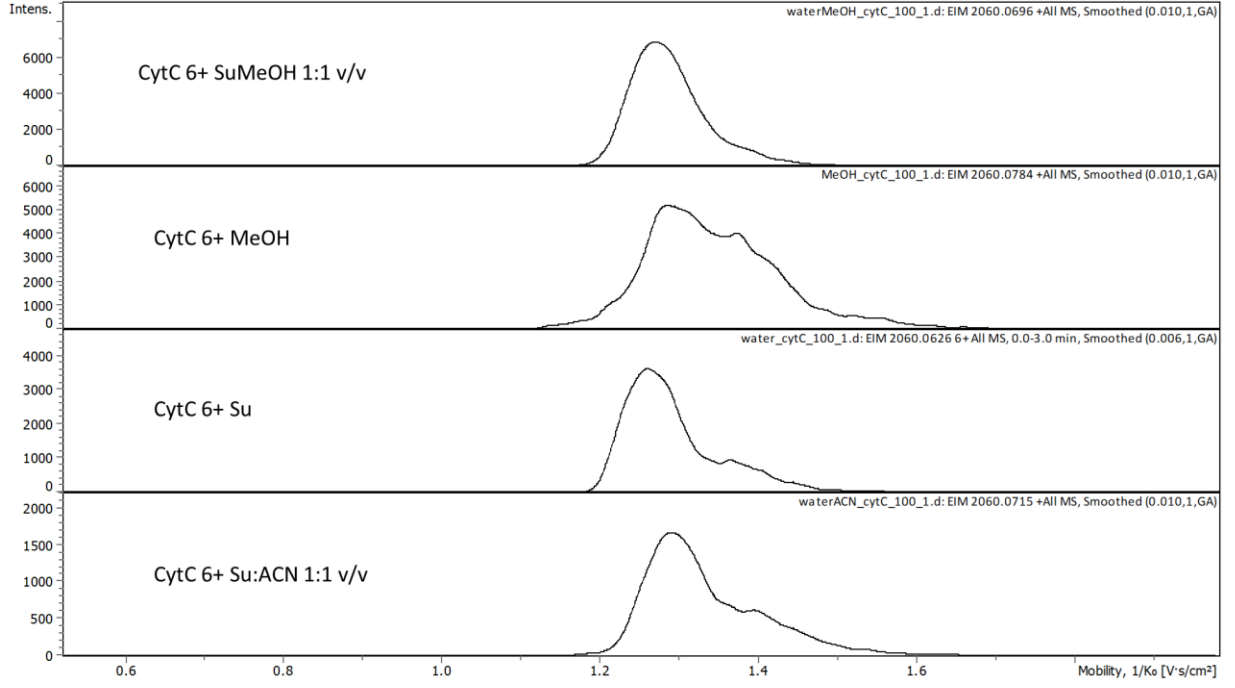
Şekil 4.10. 10 mM AAc çözeltisi içerisinde hazırlanan ve farklı çözelti pH koşullarındaki sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 7+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.

Şekil 4.10.'da verilen mobilogramlar incelendiğinde, sitokrom c proteininin pI (sitokrom c için 10-10.5) [109] noktasına yaklaştıkça, 7+ yüklü monomer iyonunun yüksek CCS bölgesindeki konformer miktarının azaldığı görülmektedir. Söz konusu analiz koşullarında daha düşük CCS değerlerine sahip, proteinin doğal formuna yakın konformerlerin baskın halde olduğu ifade edilebilir [124].



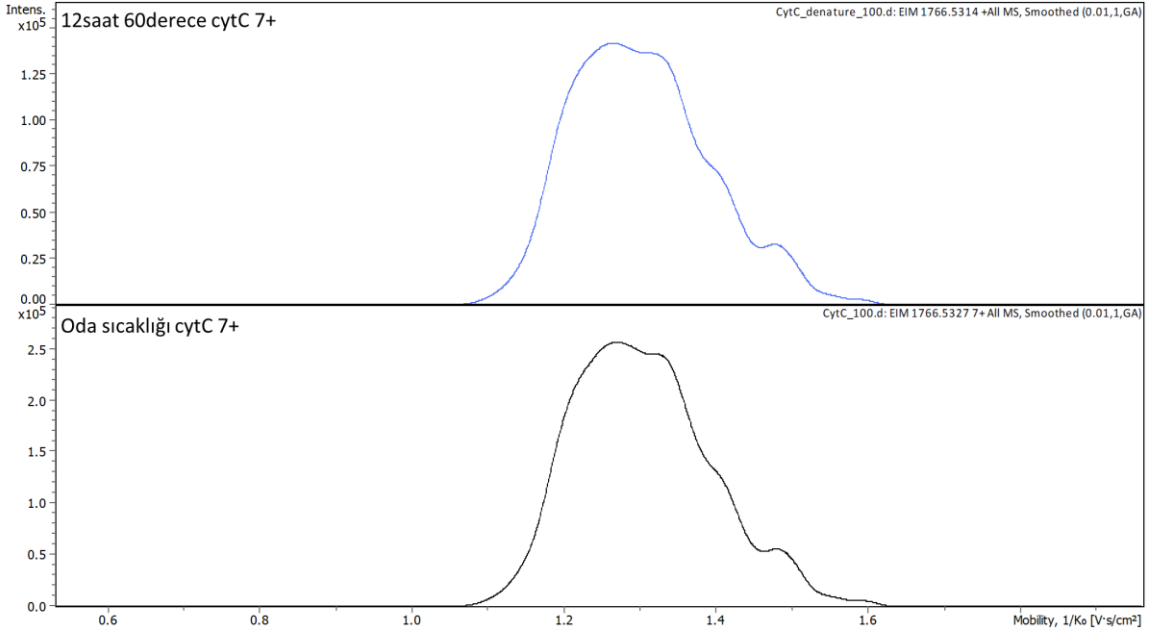
Şekil 4.11. 10 mM AAC çözeltisi içerisinde hazırlanan ve farklı çözelti pH koşullarındaki sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 6+ yüklü monomer ve 12+ yüklü dimer iyonlarına ait mobilogramları.

Sitokrom c proteininin farklı pH koşullarında hazırlanan örneklerinin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin mobilogramlar incelendiğinde, pH artışının proteinin dimerine ait sinyal şiddetini arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.11.). Ancak çalışmaların daha yararlı bir amaca ulaşması için doğal ve fizyolojik koşullara yakın koşullar üzerinde durulması uygun görülmüştür. Bu yüzden yapılan bu araştırma sadece bilgilendirme için eklenmiştir.



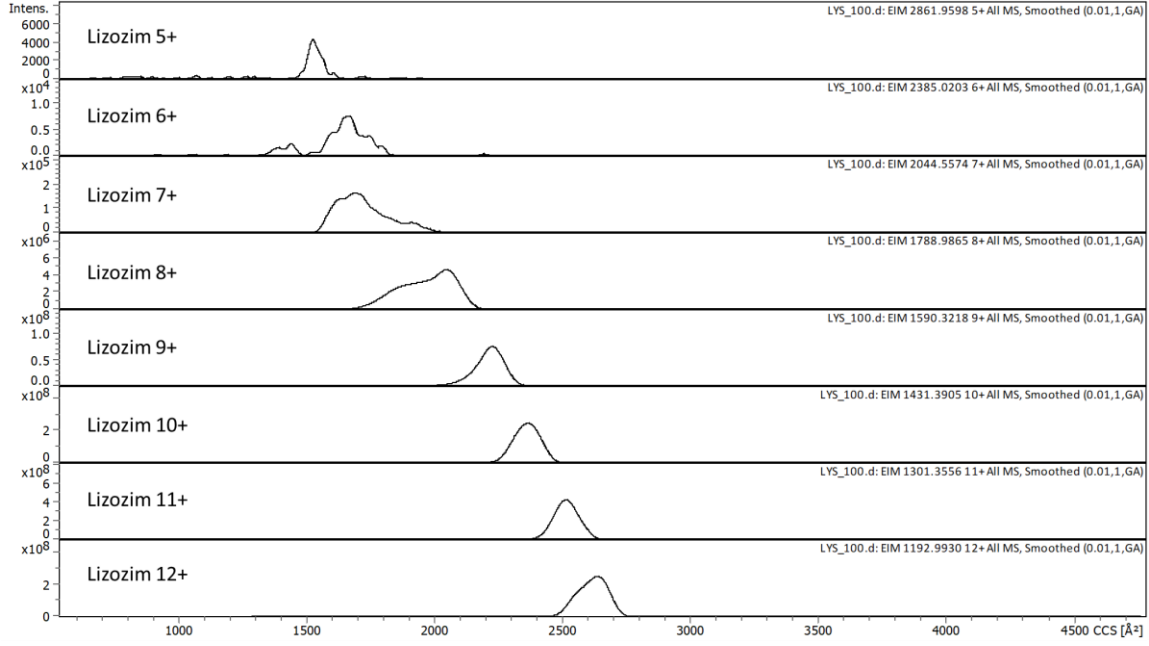
Şekil 4.12. Farklı çözeltilerinde hazırlanan sitokrom c proteininin TMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 6+ monomer ve 12+ yüklü dimer iyonlarına ait mobilogramları.

Şekil 4.12.'de verilen mobilogramlarda metanol içerisinde hazırlanan örnekler için protein yapısının denatürasyonundan kaynaklı olarak yapısının açıldığı, asetonitril-su içerisinde hazırlanan örnek için ise protein yapısının daha az etkilendiği görülmektedir. Suda hazırlanan örnek için proteinin doğal formuna yakın olan yapısını koruyabildiği ve bu sayede daha düşük CCS değerlerinde proteine ait sinyal elde edilebildiği belirlenmiştir. Ancak çalışmaların daha yararlı bir amaca ulaşması için doğal ve fizyolojik koşullara yakın koşullar üzerinde durulması uygun görülmüştür. Bu yüzden yapılan bu araştırma sadece bilgilendirme için eklenmiştir.



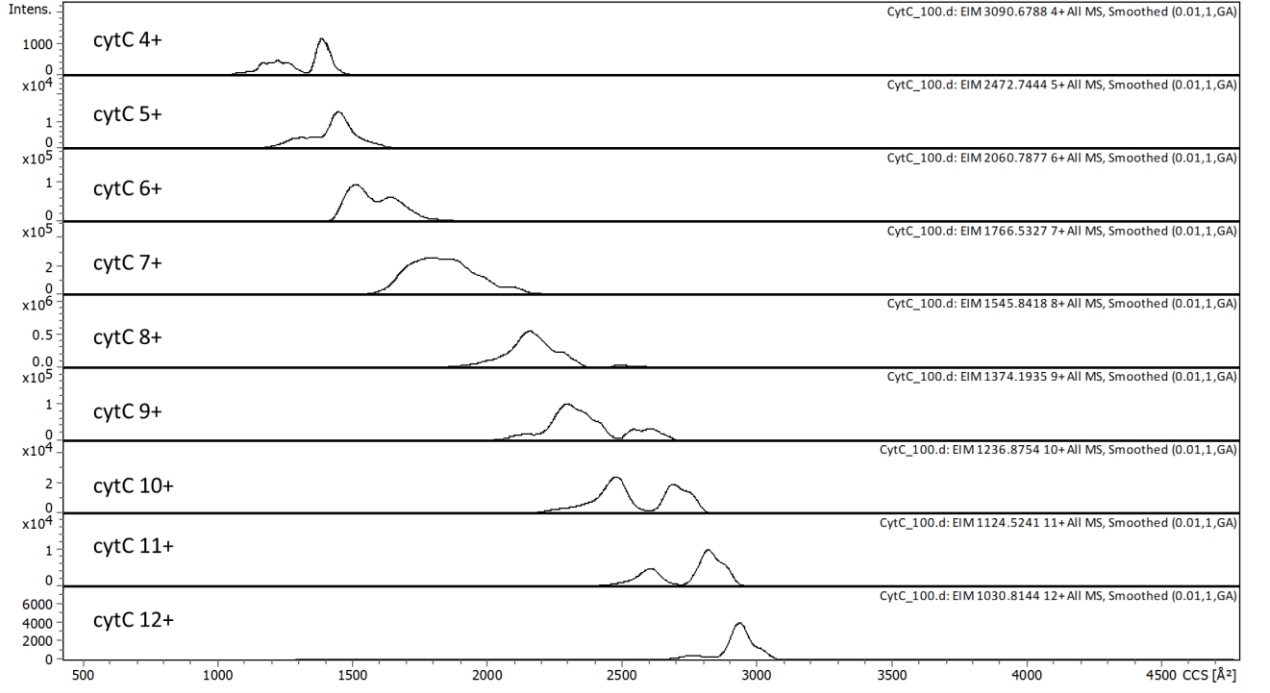
Şekil 4.13. Sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS analizinden elde edilen 7+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.

Şekil 4.13.'de sitokrom c proteininin oda sıcaklığında ve 60 °C de 12 saat kadar muamele edildikten sonra hazırlanan örneklerinin analiz edilmeleri sonucunda elde edilen mobilogramlar verilmektedir. Bu mobilogramlarda anlamlı olarak herhangi bir farklılık tespit edilememiştir. Proteinin farklı yüklü iyonları için de benzer bir sonuç elde edilmiştir. Cihaz koşullarının yeterince yumuşak olmayışından kaynaklı olarak bu koşullarda proteindeki yapısal değişikliklerin gözlenemediği düşünülmektedir. Aynı durum lizozim için de geçerlidir. Bu sonuçlara göre, kullanılan cihaz koşullarında protein örneğinin içerisinde hazırlandığı çözeltinin sıcaklığında yapılan değişimlerin protein konformasyonu üzerindeki etkileri gözlenememiştir.



Şekil 4.14. Su içerisinde hazırlanan lizozim proteininin TMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı yüklerdeki iyonlarına ait mobilogramları.

Şekil 4.14.'de görüldüğü üzere, beklendiği gibi, lizozim proteini iyonlarının gaz fazındaki yük değerlerinin artmasıyla birlikte CCS değerlerinin de arttığı gözlenmektedir. İyonlardaki yük artışı, protein yapısındaki kulombik itişmelerin artmasına neden olarak yapının açılmasına neden olmaktadır. CCS değerlerindeki bu artış, 7+ yükten 8+ yüke geçiş sırasında çok daha bariz bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.14.).



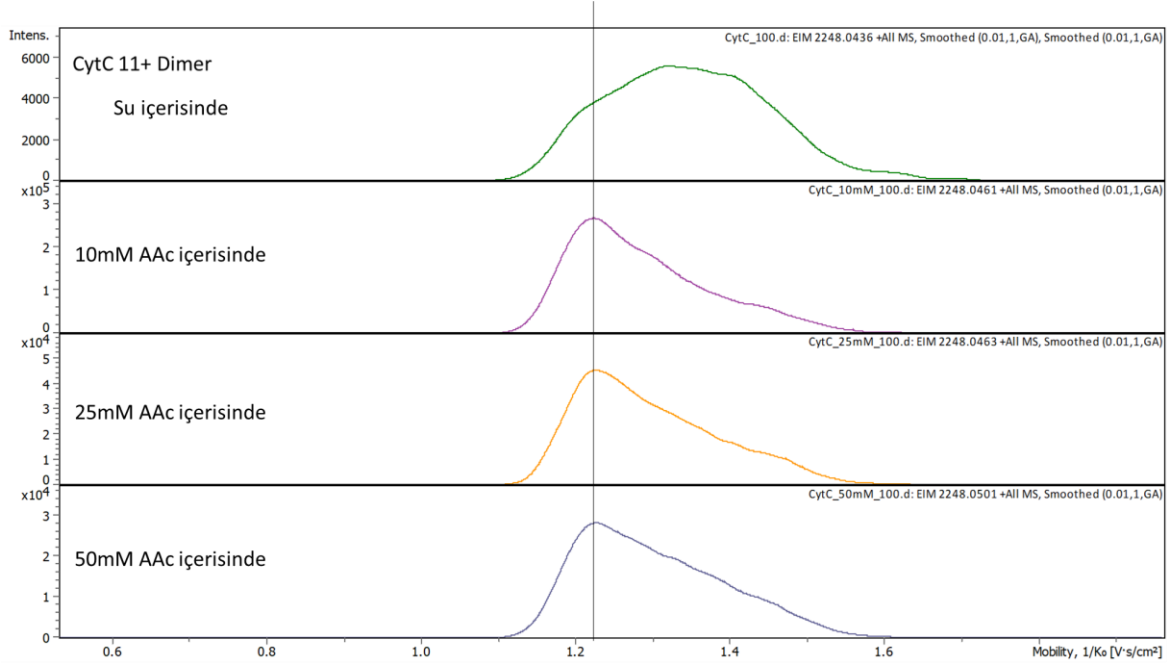
Şekil 4.15. Su içerisinde hazırlanan cytC proteininin Tims-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı yüklerdeki iyonlarına ait mobilogramları.

Lizozimde olduğu gibi, sitokrom c proteininde de yük değerleri ile doğru orantılı olarak artan CCS değerleri, protein yapısındaki yükler arasındaki kulombik itişmelerin yapının açılmasına neden olduğunu göstermektedir (Şekil 4.15.). CytC proteini için 6+ yükten 7+ yüke ve 7+ yükten 8+ yüke geçişte yapıdaki açılma, daha iyi görülmektedir. Lizozimden farklı olarak sitokrom c için 9+ yükten başlayarak yük artışıyla birlikte kompakt konformer bolluğunun azaldığı ve daha geniş yapılara geçişin olduğu gözlenmiştir. Yani, cytC proteini yük artışı sonucunda iki farklı konformere sahip olmuş ve yüksek yük değerlerine geçildikçe kompakt konformer kaybolmuştur.

Sitokrom c proteininde lizozimden farklı olarak özellikle disülfid bağlarının olmayışından kaynaklı olarak yapıdaki yük değişikliklerinin farklı etkilere neden olduğu düşünülmektedir. Sitokrom c için yüke bağlı olarak her iki konformerde de kararlı halde kalmıştır. Yüksek yüklerde geniş konformer daha kararlı olduğu gözlemlenmiştir.

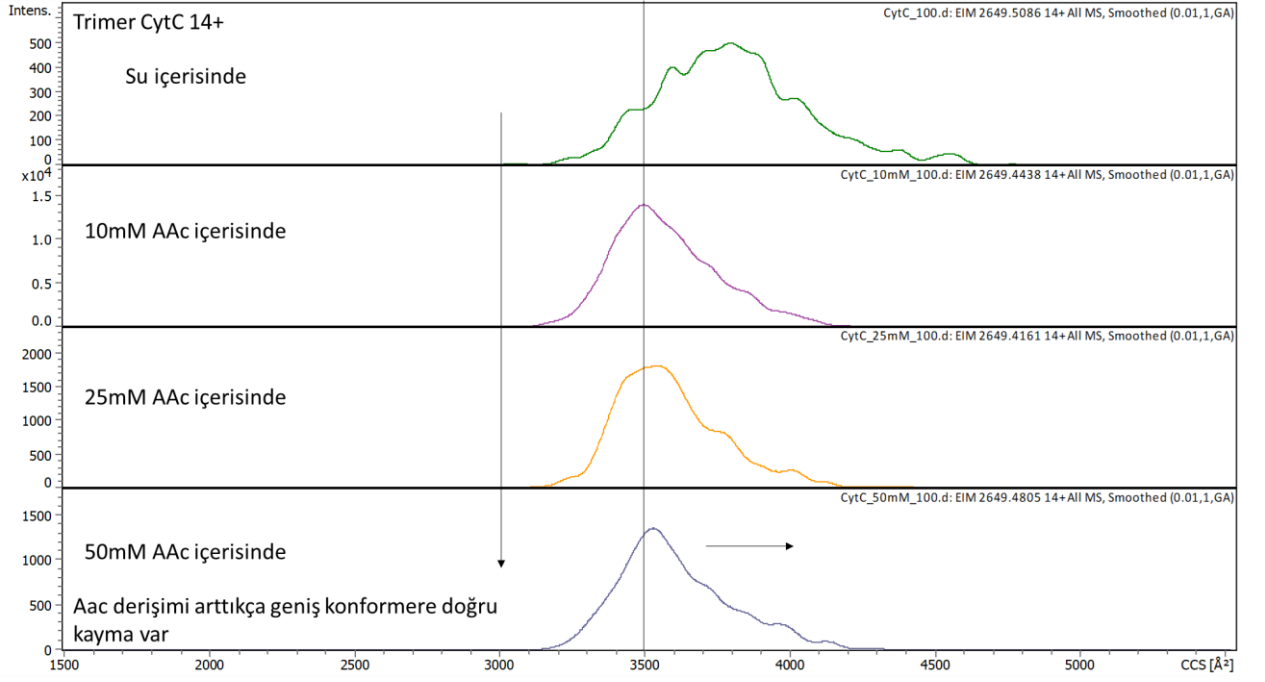
Sitokrom c ile kıyaslandığında lizozim proteini yapısındaki disülfid bağlarının yapının korunmasını sağlayarak 6+ dan 7+ ya geçişte yapı bütünlüğünü koruduğu, ancak 8+ dan 9+ ya geçerken de yapının kompakt konformere tekrar dönmesine izin vermediği gözlenmiştir (Şekil 4.14.).

4.2. Proteinlerin farklı derişimlerdeki AAc çözeltilerinde hazırlanmalarına bağı olarak multimer oluşumunda gözlenen değişimler



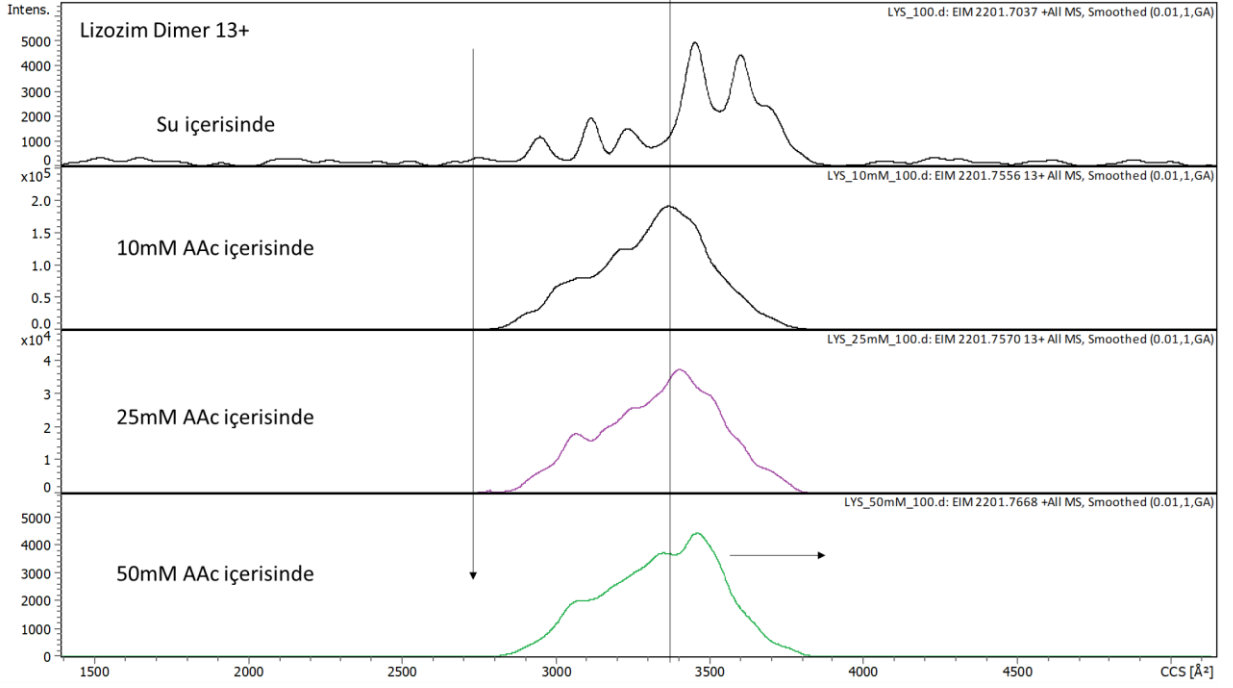
Şekil 4.16. Suda ve farklı derişimlerdeki AAc çözeltilerinde hazırlanan sitokrom c proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 11+ yüklü dimer iyonuna ait mobilogramları.

Şekil 4.16.'da verilen mobilogramlarda sitokrom proteininin içerisinde hazırlandığı çözeltide AAc bulunduğu zaman proteinin 11+ yüklü dimer iyonu oluşumunun arttığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, AAc eklenmesi ile protein konformasyonunun daha kapalı hale geldiği gözlenmektedir. AAc derişimi artışıyla geniş konformerlerde artış gözlemlenmiştir.



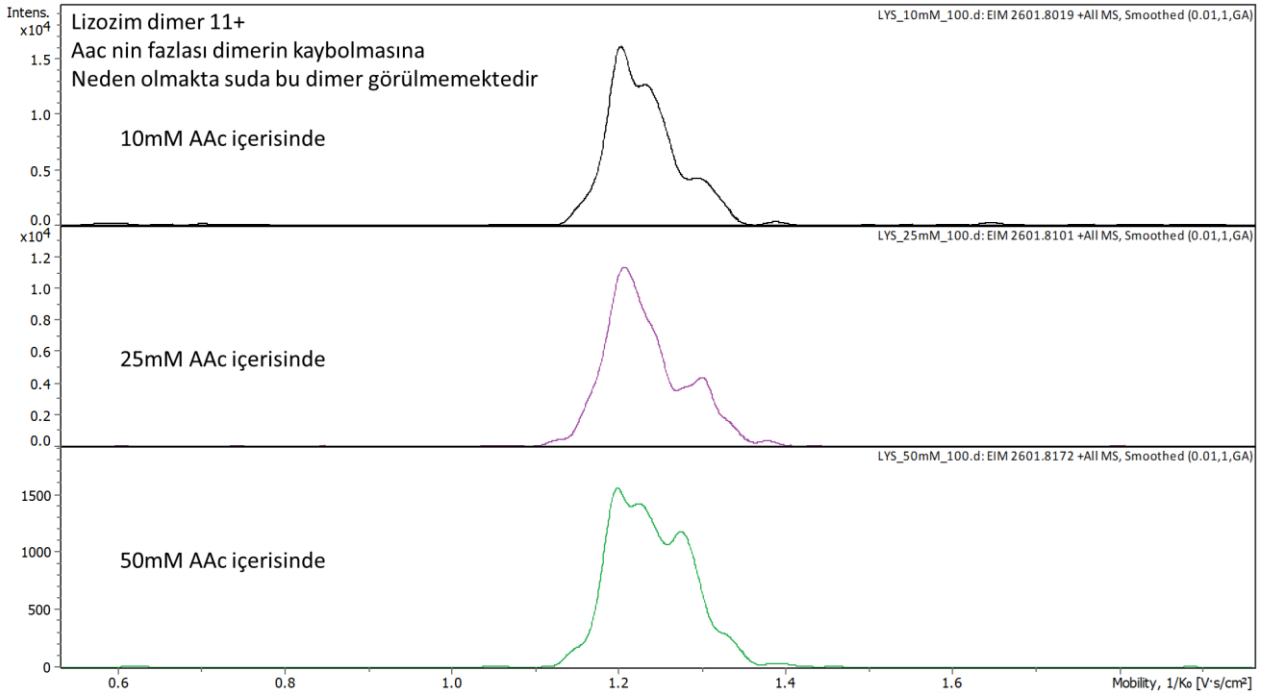
Şekil 4.17. Suda ve farklı derişimlerdeki AAc çözeltisinde hazırlanan sitokrom c proteininin TMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 14+ yüklü trimer iyonuna ait mobilogramları.

Sitokrom c proteininin AAc çözeltisi içerisinde hazırlanan örneklerin analizlerinden elde edilen mobilogramlarda suda hazırlanan örneğe göre 14+ yüklü trimer iyonunun da daha kapalı hale geldiği görülmektedir (Şekil 4.17.). Bunun yanı sıra, ortamda 10 mM derişimde AAc bulunması durumunda 14+ trimer iyonunun sinyal şiddetinin yükseldiği de belirlenmiştir. Ancak, ortamdaki AAc derişiminin artmasıyla birlikte daha geniş konformerin bolluğunda arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.18. Suda ve farklı derişimlerdeki AAc çözeltilisinde hazırlanan lizozim proteininin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 13+ yüklü dimer iyonuna ait mobilogramları.

Şekil 4.18.'de verilen mobilogramlar, ortamda 10 mM derişiminde AAc bulunmasının lizozim proteininin 13+ yüklü dimer iyonuna ait sinyal şiddetinin arttırdığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, sitokrom c proteininde de olduğu gibi, örnek çözeltilisinde AAc bulunmasının suya göre protein yapısını kapatarak CCS değerini azalttığı ve AAc derişiminin artmasıyla geniş konformer bolluğunun yükseldiği gözlenmiştir.



Şekil 4.19. Farklı derişimlerdeki AAc çözeltisinde hazırlanan lizozim proteininin TMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 11+ yüklü dimer iyonuna ait mobilogramları.

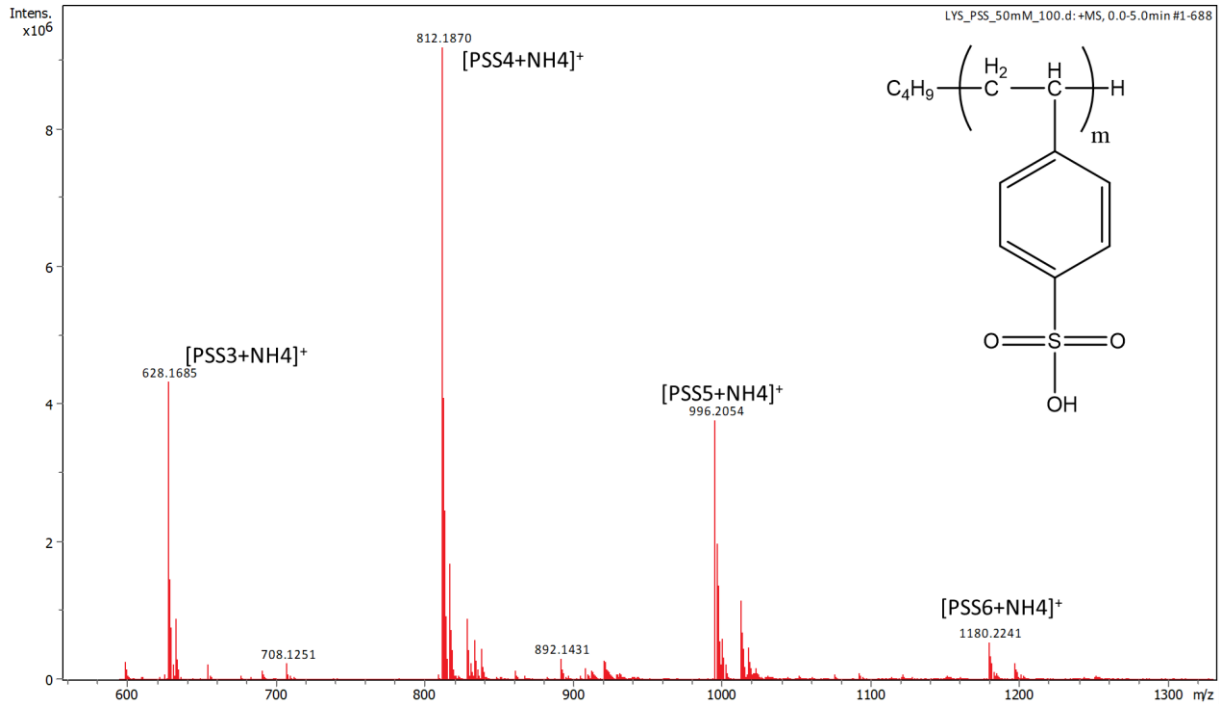
Lizozimin 11+ dimeri su içerisinde görülmezken bir miktar AAc eklendiğinde görülmektedir. AAc derişiminin artması ile dimer kaybolmuştur (Şekil 4.19.).

AAc derişimleri multimer oluşumunu arttırabilmekte veya derişimin fazla olmasından kaynaklı azaltabilmektedir. Buna ek olarak AAc derişimlerinin değiştirilmesinin dahi protein konformasyonuna etkileri bulunmaktadır. Bu yüzden dolayı ESI-MS sistemlerde sıklıkla kullanılan AAc tuzunun derişimleri özenle seçilmelidir.

4.3. Polistren Sülfonat - Protein Etkileşimleri

Tez kapsamında proteinlerin polianyonik özelliğe sahip polistren sülfonat (PSS) polielektroliti ile hazırlanan karışımları TMS-TOF-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde polielektrolit varlığında ve farklı uzunluktaki polielektrolit zincirleri ile etkileştikten sonra proteinlerin yapılarında meydana gelen konformasyonel değişimler incelenmiştir.

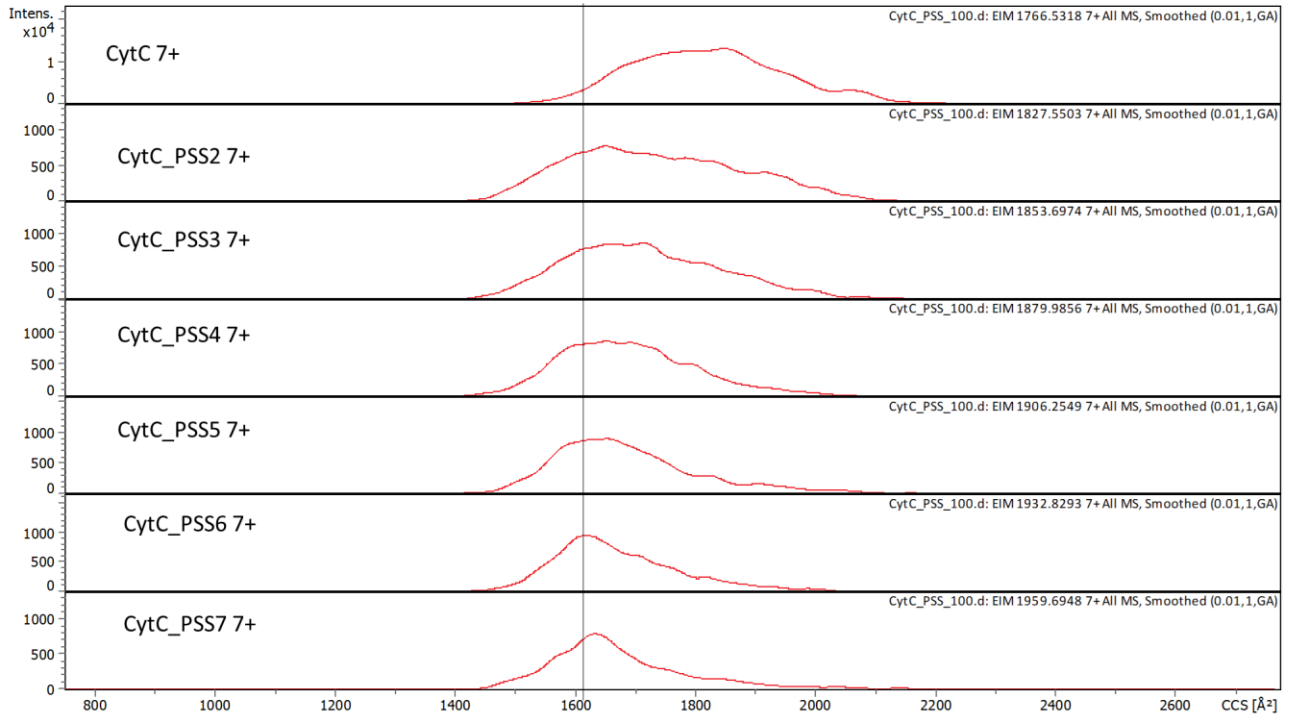
Polistren Sülfonat Polianyonunun TIMS-TOF-MS analizi



Şekil 4.20. 50 mM AAC çözeltisindeki PSS polimerinin TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin ESI-MS spektrumu.

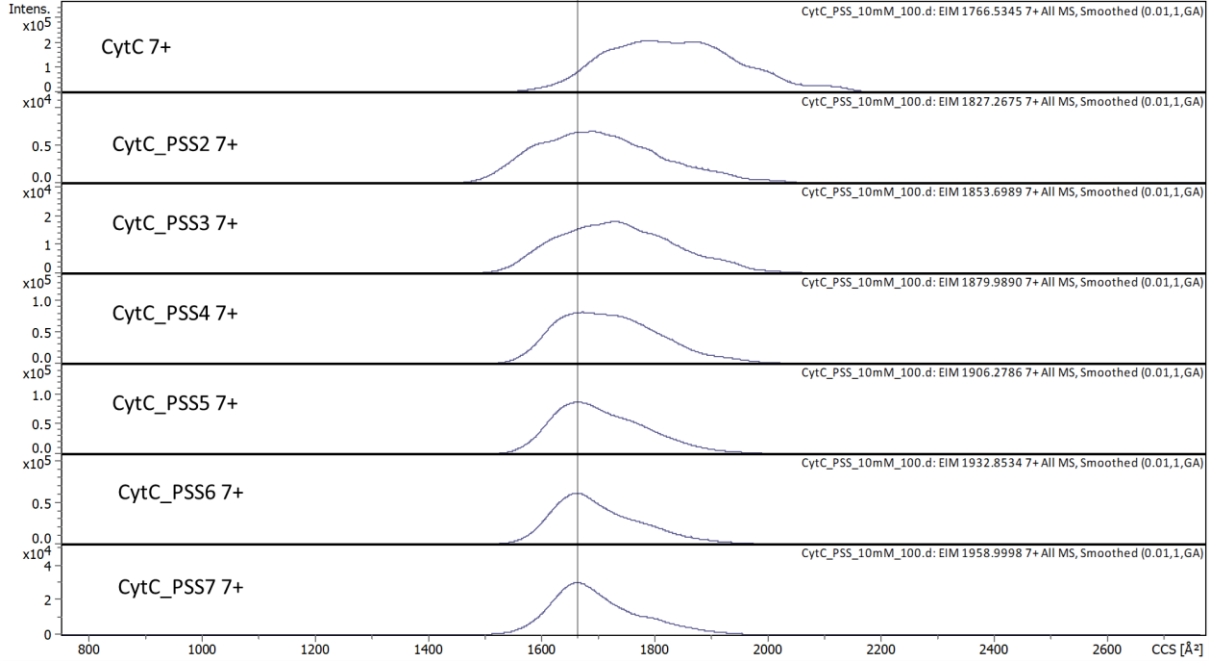
Tezin bu bölümünde yapılan çalışmaların başlangıcında PSS polielektroliti tek başına analiz edilmiştir. Sadece suda hazırlanan PSS örneğinin pozitif iyon modunda gerçekleştirilen analizlerinden elde edilen ESI-MS spektrumunda hiçbir sinyal gözlenememiştir. Aynı örnek 10 mM derişimindeki amonyum asetat çözeltisi içerisinde hazırlandığında elde edilen kütle spektrumunda farklı zincir uzunluğundaki PSS iyonlarına karşılık gelen amonyum katımlı ve tek yüklü sinyaller $[M+NH_4]^+$ gözlenebilmiştir (Şekil 4.20.). Şekil 4.20.'de verilen kütle spektrumundaki ardışık sinyaller arasında her bir stiren sülfonat tekrar eden birimi kütesine (184 Da) denk gelen m/z 184 farkları gözlenmiştir.

4.3.1. Polistiren sülfonat-sitokrom c Etkileşimleri



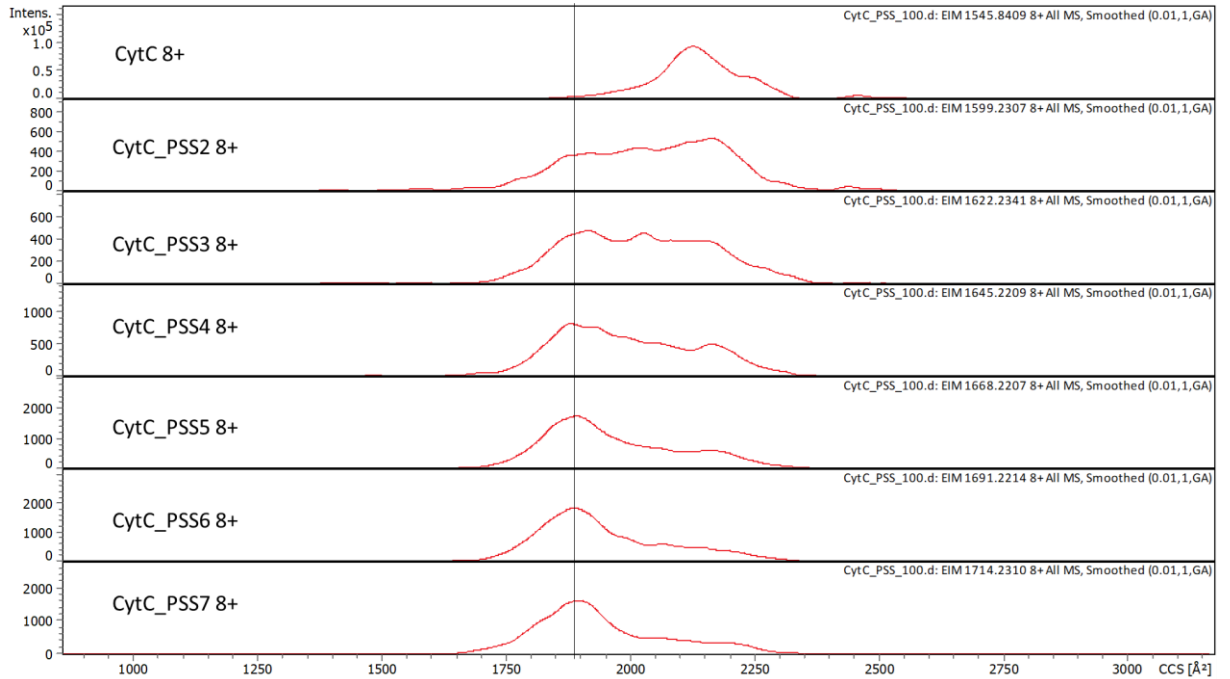
Şekil 4.21. Su içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 7+ yüklü sitokrom c-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.

Şekil 4.21.'deki 7+ yüklü protein-PSS komplekslerine ait mobilogramları incelendiğinde sitokrom c proteinine PSS2 zincirinin bağlanması sonucunda yapıda bariz bir şekilde kapanmanın meydana geldiği anlaşılmaktadır. Proteine bağlanan PSS zincirinin uzunluğunun artması ile birlikte yapıdaki kapanmanın da artması, protein-PSS etkileşiminin toplam yapıdaki yük itişmelerini azaltarak az da olsa kapanmayı sağladığını göstermektedir.



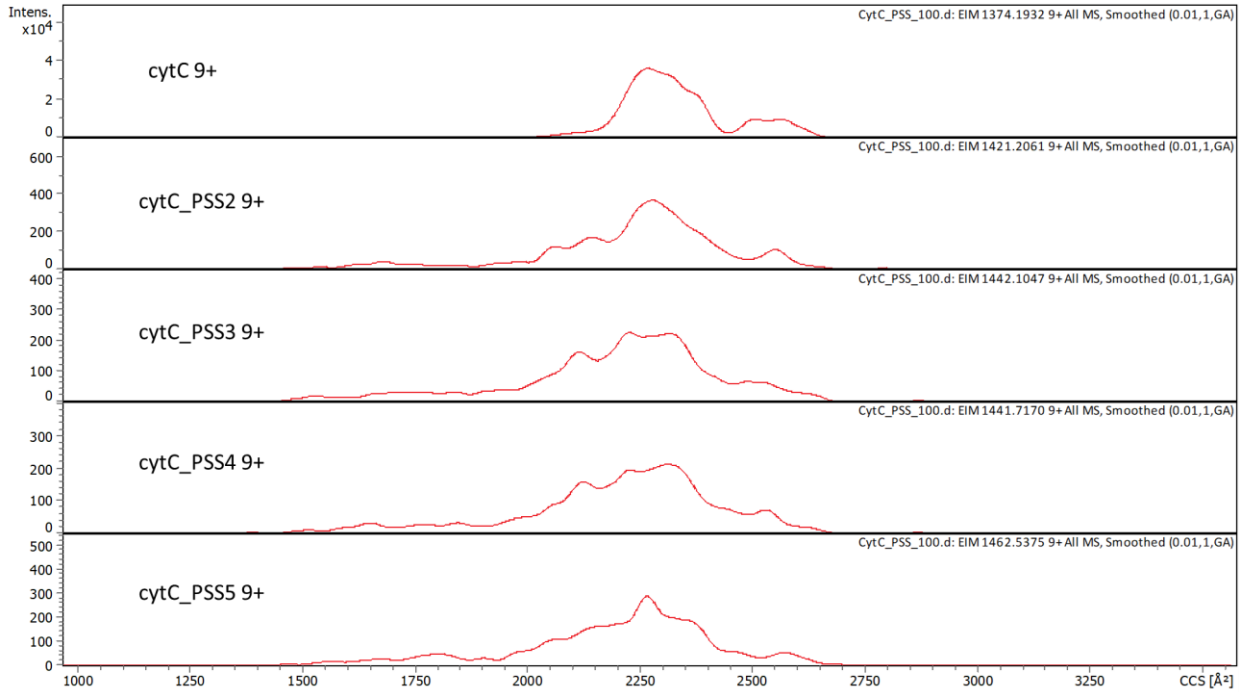
Şekil 4.22. 10mM AAc içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının TMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 7+ yüklü cytC-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.

Şekil 4.22.'de sitokrom c-PSS2 kompleksinde AAc sayesinde yapının bir miktar daha hızlı kapandığı gözlemlenmiştir.



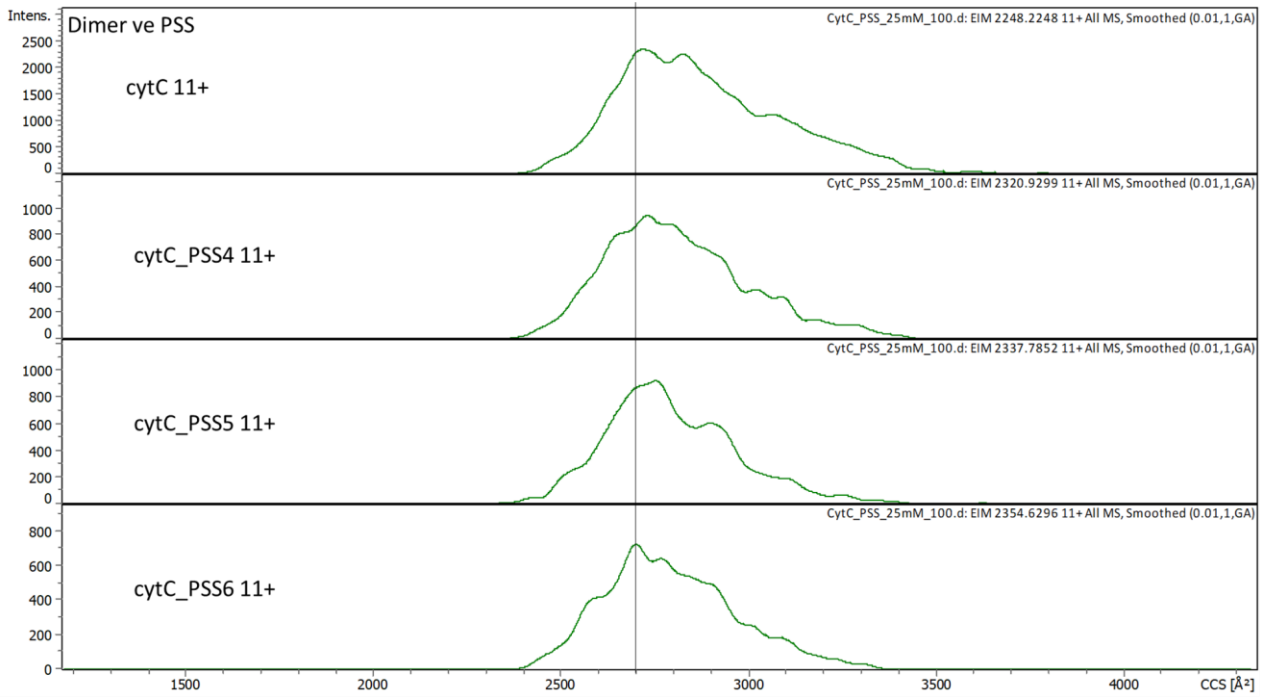
Şekil 4.23. Su içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 8+ yüklü sitokrom c-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.

8+ yüklü sitokrom c-PSS komplekslerine ait mobilogramları incelendiğinde sitokrom c proteini PSS2 ile etkileşime girdiğinde gaz fazındaki protein yapısının yük dengesini bozarak çok sayıda konformer oluşumuna neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.23.). Bu durumun, 8+ yük durumunda var olan yüksek kulombik itişmelerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, 7+ yük durumunda olduğu gibi PSS2 zincirinin etkileşimi, doğrudan yapıyı kapatmamıştır. Sonrasında 8+ yük durumunda da protein ile etkileşen PSS zincirinin uzunluğunun artması sonucunda yük dengesi sağlanarak yapı kapanabilmektedir. PSS7 zincirinin etkileşimi sonucunda oluşan komplekse ait mobilogram dikkatle incelendiğinde ise, CCS değerinin artarak yapının biraz açıldığı görülmektedir. Bu durumun yeniden yapıdaki yük dengelerinin bozulmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.24. Su içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 9+ yüklü sitokrom c-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramlar.

Önceki yük durumlarına göre yapısında daha fazla sayıda yük bulunduran 9+ yüklü sitokrom c-PSS kompleks iyonlarında sitokrom c 9+ yüklü iyonunda ise kulombik itişmeler daha baskın haldedir. Bu nedenle, Şekil 4.24.'de verilen mobilogramlarda da görüldüğü gibi, protein yapısına PSS zincirlerinin eklenmesi 9+ yük durumunda yapıyı bariz olarak kapatmamaktadır.

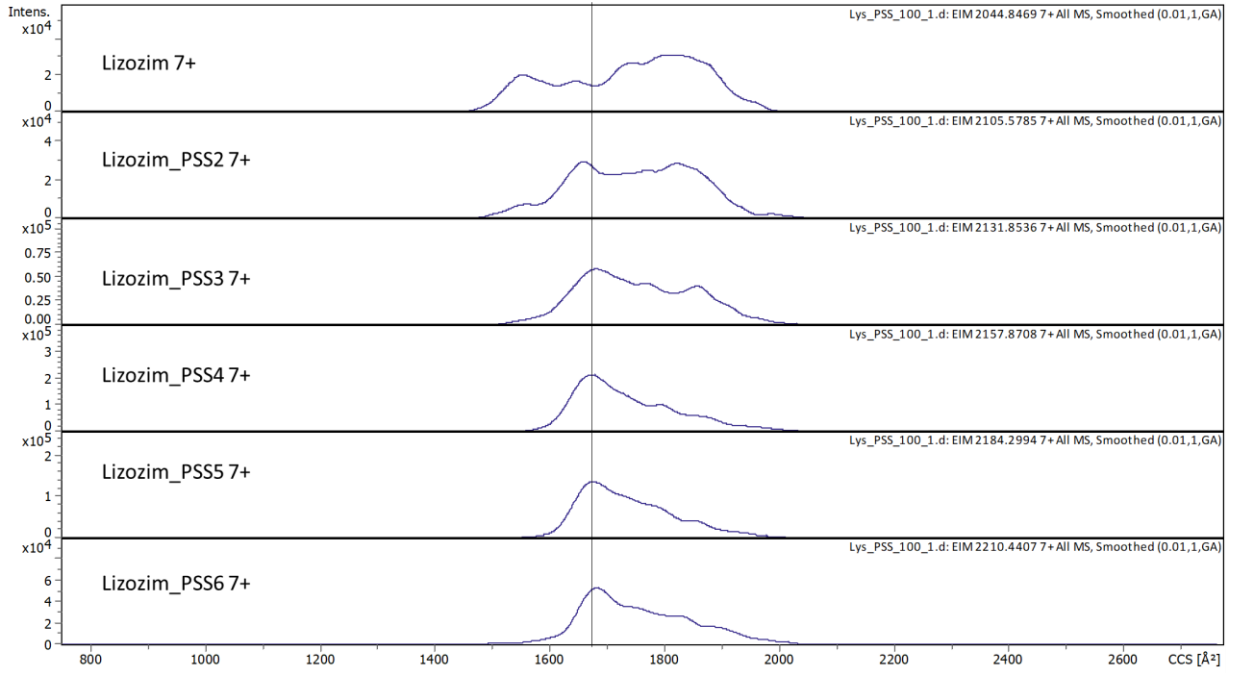


Şekil 4.25. 25mM AAc içerisindeki protein-PSS karışımının TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin sitokrom c 11+ yüklü dimerine farklı PSS monomerlerinin proteinle etkileşim mobilogramları.

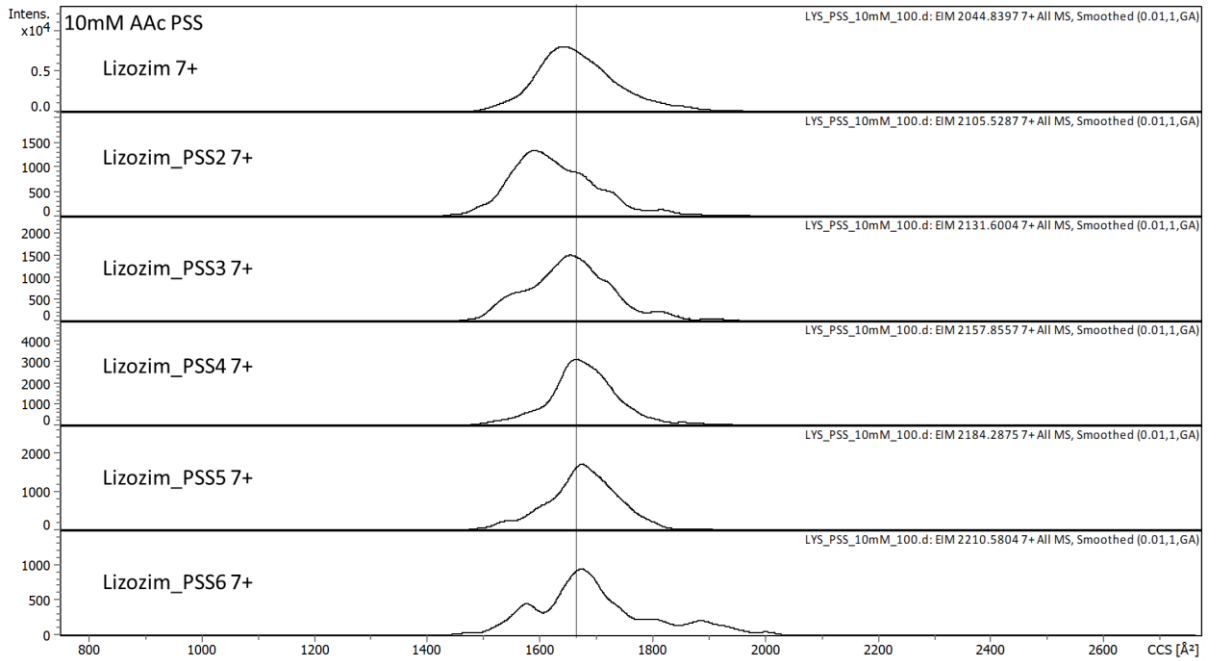
Sitokrom c 11+ dimer iyonunda, protonlanma fazla olduğu halde 9+ monomer iyonuna göre yapı PSS monomer artışı ile daha fazla kapanmıştır. Toplam yük arttıkça kapanmanın azalmasından ziyade protein başına düşen yüke bağlı olarak PSS proteini kompaktlaştırmaktadır. Bu dimerin kompleksleri suda görülememiştir.

Dimere bağlanan PSS zincir uzunluğu ne kadar küçükse o kadar fazla konformer görülmüş bunun nedeni protein yüzeyinde daha fazla bölgeden bağlanabilmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. PSS zincir uzunluğu arttıkça protein yüzeyine bağlanabileceği bölge sayısı azalmakta ve konformer dağılımında daralmaktadır.

4.3.2. Polistiren sülfonat-Lizozim Etkileşimleri



Şekil 4.26. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 7+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.

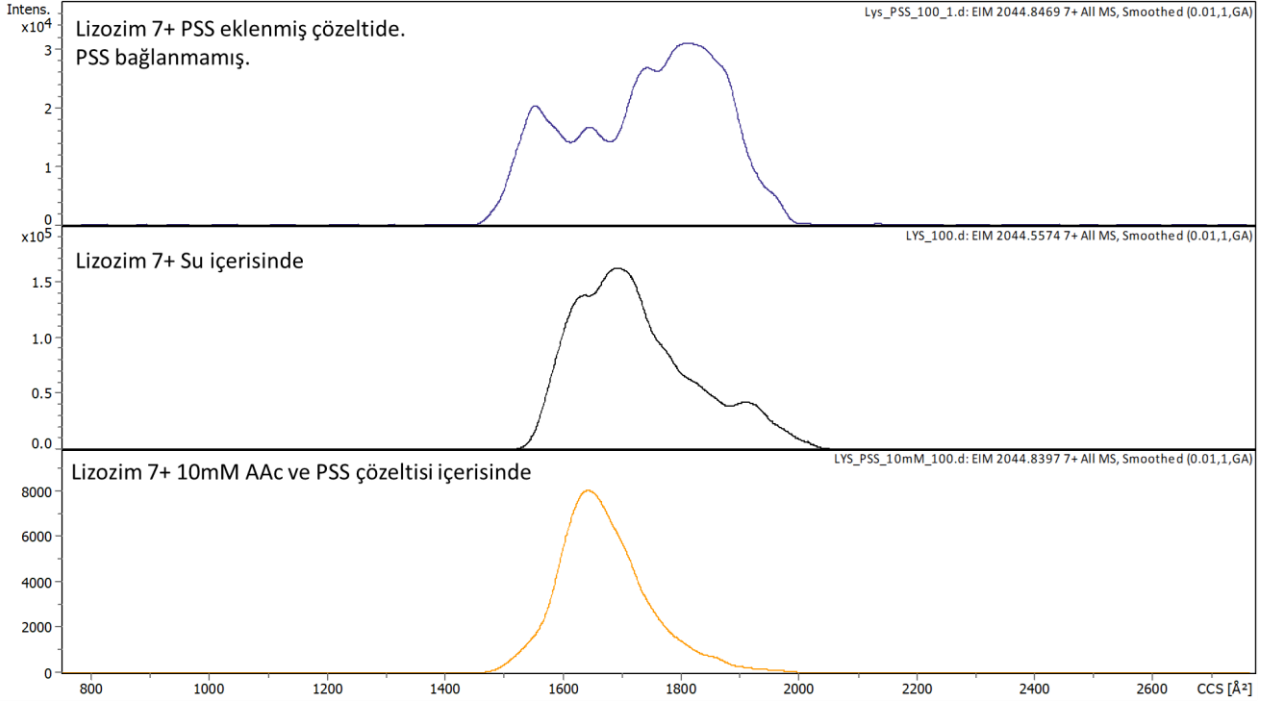


Şekil 4.27. 10 mM AAc içerisindeki protein-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 7+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.

Lizozim proteininin 10 mM derişimindeki AAc çözeltisinde ve suda hazırlanan örneklerinin analizlerinden elde edilen veriler kıyaslandığında, su ortamında protein ile etkileşen PSS zincirinin uzunluğunun artmasının yapıyı kapattığı, 10 mM derişimindeki AAc ortamında sadece PSS2 zinciri yapıyı kapatırken zincir uzunluğu arttıkça yapının açılmakta olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.27.). PSS2 takıldığında 10 mM derişimindeki AAc varlığında proteinin yük dengesine ulaşmasından kaynaklı olarak yapının kapanmış olduğu ve PSS zincir uzunluğu artışının bu yük dengesini bozmasıyla yapının açıldığı düşünülmektedir. PSS zincir uzunluğu artışına rağmen 10 mM derişimdeki AAc varlığında (Şekil 4.27.) su ile kıyaslandığında (Şekil 4.26.) yapı halen daha kompakt haldedir.

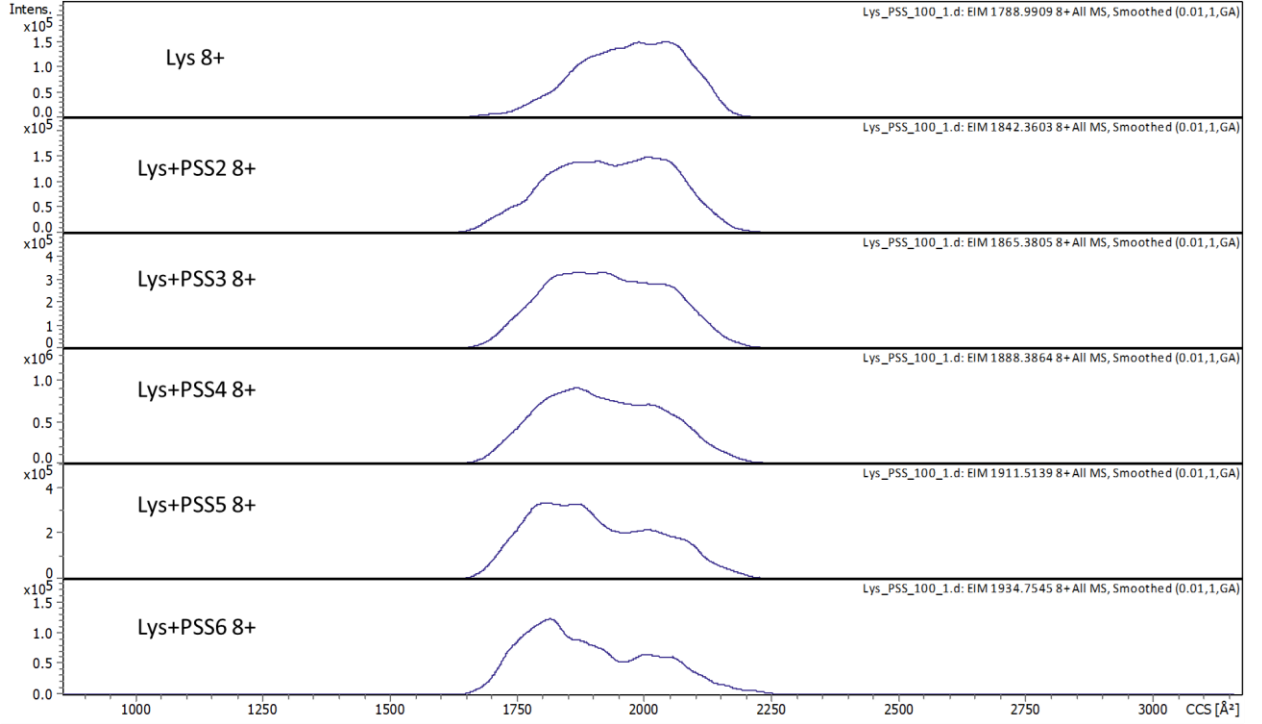
Su içerisinde lizozime karşıt iyon olarak sadece PSS zincirleri bulunmaktadır. PSS zincirlerinin uzunluklarının artması ile birlikte yük dengesinin sağlanabilmesi sonucunda itişmelerinin azalması, protein yapısının kapanmasına neden olmaktadır.

7+ yük durumunda konformasyonel özellikler ile ilgili olarak karşılaşılan bu değişimler, kulombik itişmelerin daha baskın olduğu 8+ yük durumunda görülmemiştir. 8+ yük durumunda AAc çözeltisi ve su içerisinde lizozime bağlanan PSS zincirinin uzunluğu arttıkça yapının kapandığı gözlenmiştir.



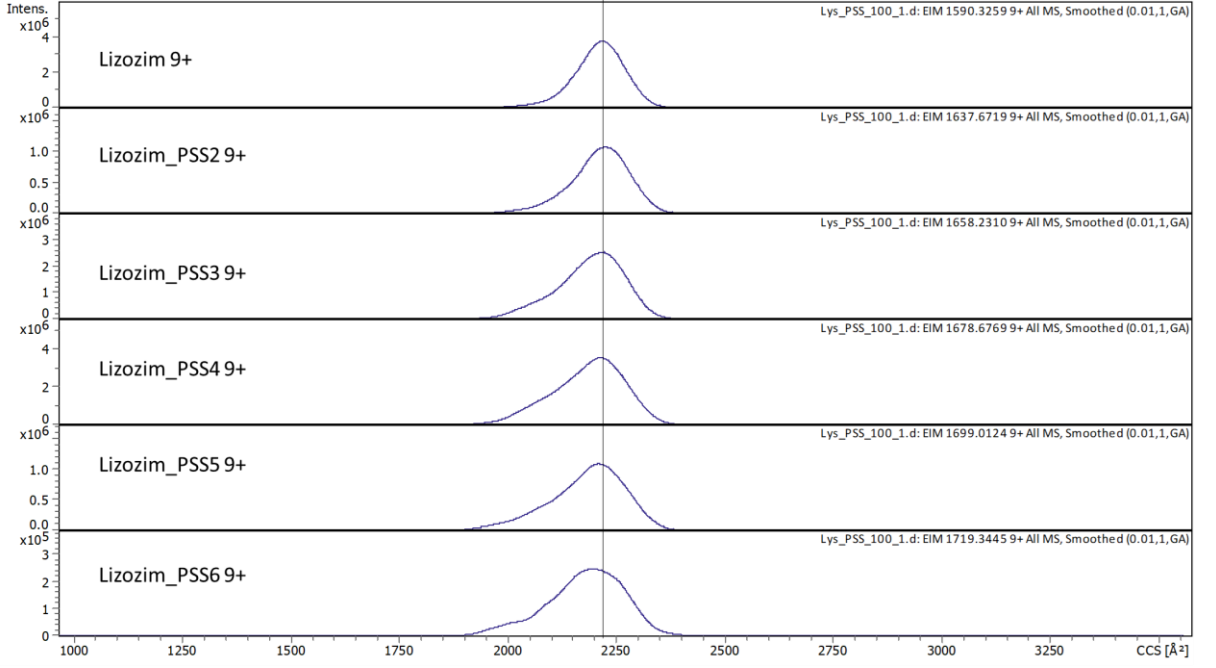
Şekil 4.28. Farklı çözelti ortamında hazırlanan lizozimin, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 7+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.

PSS zincirlerinin bulunduğu ortamda lizozim proteinine herhangi bir PSS zincirinin takılmadığı durumda proteinin 7+ yüklü iyonunun yapısının açıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.28.). Bunun nedeninin IEM mekanizmasının açıklamasındaki gibi çözücü uzaklaşması (desolvasyon) sırasında proteine takılı olan PSS zincirinin yapıdan uzaklaşması ve bundan dolayı hidrojen bağları ile proteine bağlı PSS zincirinin ayrılması sırasında proteinin yük dengelerinin bozulması olduğu düşünülmektedir. Bu sayede elde edilen mobilogramda daha geniş konformerler gözlenebilmiştir. Aynı koşullarda PSS varlığında ortama 10 mM derişiminde AAc çözeltisi eklendiğinde yük dengesinin amonyum ve asetat iyonları tarafından sağlanabilmesi nedeniyle yapıda benzer bir açılma durumunun meydana gelmediği görülmüştür (Şekil 4.28.)



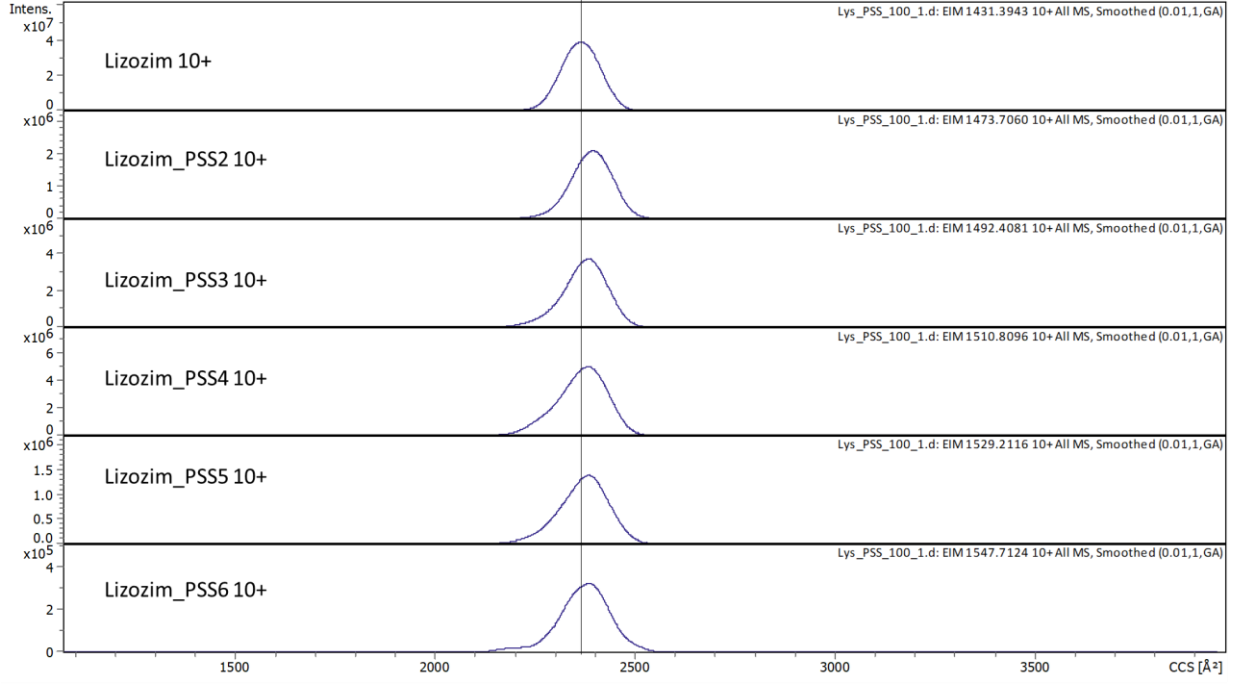
Şekil 4.29. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının , 3 kV kapiler voltaj değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 8+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.

8+ yük durumunda lizozim proteinine PSS zincirlerinin takılması ve zincir uzunluğunun artması ile birlikte yapının bariz bir şekilde kapandığı gözlenmiştir (Şekil 4.29.). Lizozim protein iyonunun özellikle 8+ yük durumunda açılmış ve esnek bir yapıda (unfolded) olması nedeniyle, PSS bağlanmasına bağlı olarak konformasyonunda meydana gelen değişimler bu yük durumunda çok daha bariz bir şekilde izlenebilmektedir.

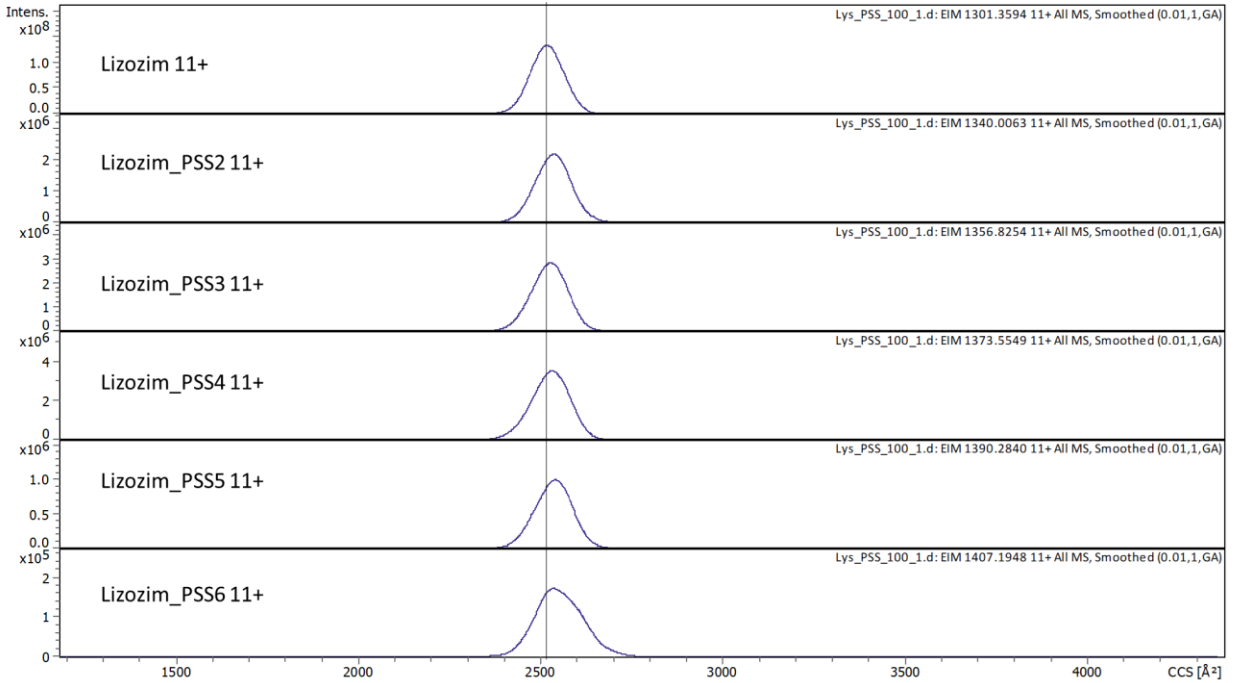


Şekil 4.30. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 9+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.

Kulombik itişmelerin daha baskın olduğu 9+ yük durumunda PSS zincirlerinin bağlanması ile birlikte lizozim proteininin yapısında bariz bir kapanma gözlenmemiştir (Şekil 4.30.). Ancak PSS6 zincirinin proteine bağlanmasının yapıda bir miktar kapanmaya neden olduğu görülmüştür. 9+ gibi yüksek yük durumunda elde edilen bu veriler, ancak PSS6 gibi daha fazla sayıda tekrar eden birim içeren PSS zincirinin proteine bağlanmasıyla kulombik itişmelerin önüne geçilebildiğini göstermektedir.

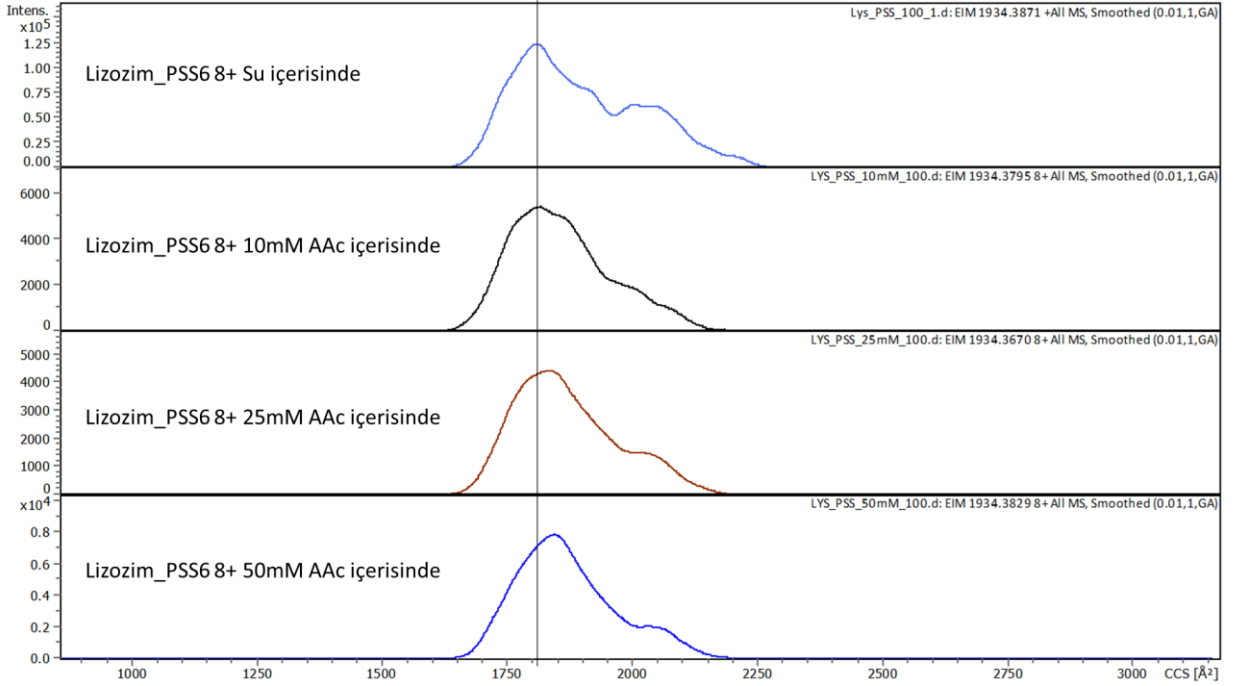


Şekil 4.31. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 10+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.



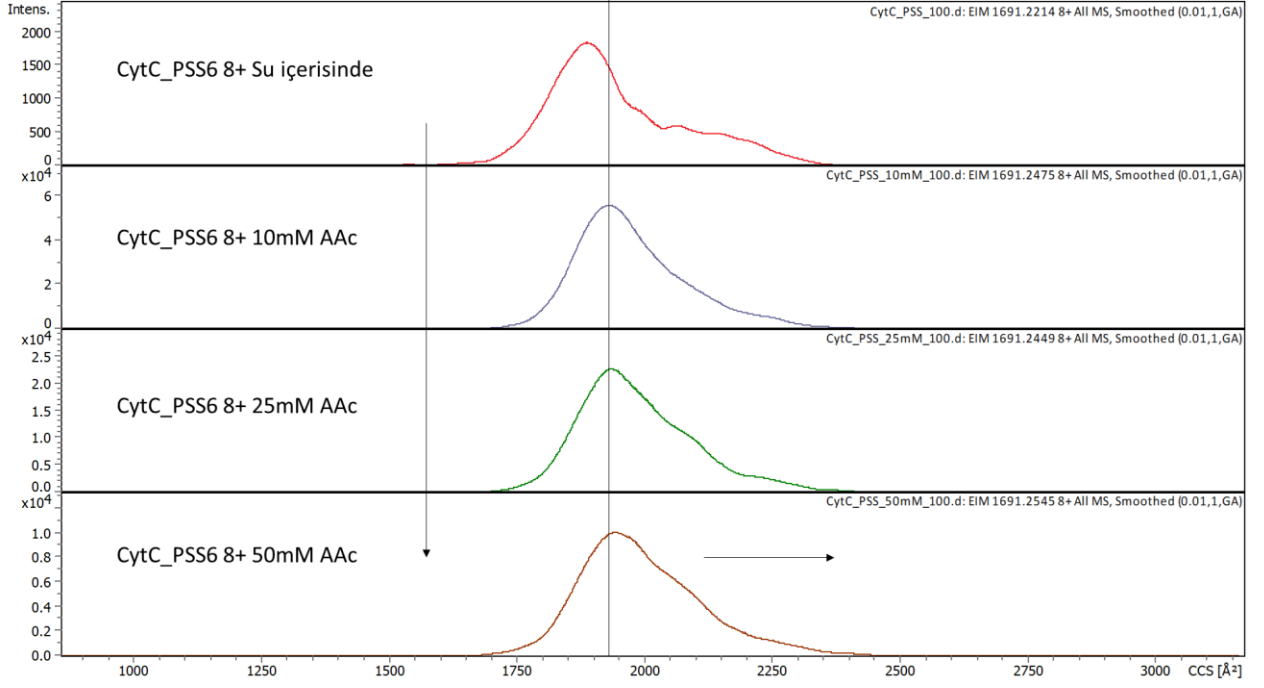
Şekil 4.32. Su içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin farklı zincir uzunluğundaki PSS zinciri içeren 11+ yüklü Lizozim-PSS kompleks iyonlarına ait mobilogramları.

7+ ve 8+ gibi daha düşük yük durumlarına göre, 9+, 10+ ve 11+ yük durumlarında lizozim proteinine bağlanan PSS zincirlerinin uzunluğunun artmasının yapının konformasyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir (Şekil 4.29. - Şekil 4.32.).



Şekil 4.33. Su ve farklı derişimdeki AAc çözeltileri içerisindeki Lizozim-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 8+ yüklü lizozim-PSS6 kompleks iyonuna ait mobilogramları.

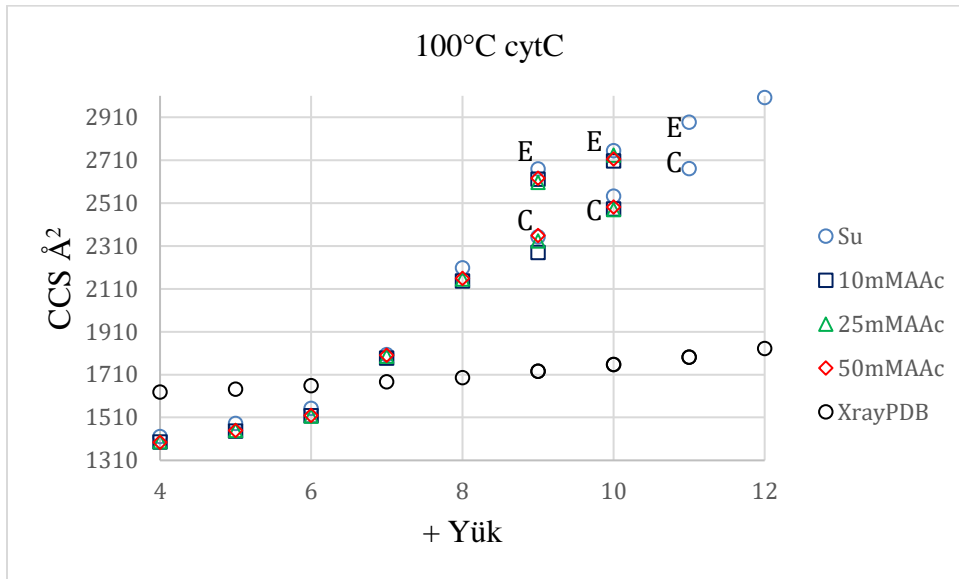
Protein-PSS karışımının içerisinde bulunduğu AAc çözeltilisinin derişimi arttıkça lizozim proteinine PSS6 zincirinin bağlı olduğu 8+ yüklü kompleks iyonunun yapısının proteine PSS2 zincirinin bağlandığı duruma göre daha az miktarda kapandığı gözlenmektedir (Şekil 4.33.). PSS6-protein etkileşiminde de var olan AAc karşıt iyon etkisi, protein üzerindeki protonlanmış bölgeleri dengelemiş ve PSS6 zincirinin proteine bağlanma olasılığını azaltmıştır. Bu durumda AAc derişiminin artışı ile birlikte yapının bir miktar açıldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu veriler, protein ile polielektrolit arasında kompleks oluşumu sırasında ortamdaki karşıt iyon miktarının artmasının yapıdaki kapanma oranını azalttığını göstermektedir.



Şekil 4.34. Su ve farklı derişimdeki AAc çözeltileri içerisindeki sitokrom c-PSS karışımının, TIMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 8+ yüklü cytC-PSS6 kompleks iyonuna ait mobilogramları.

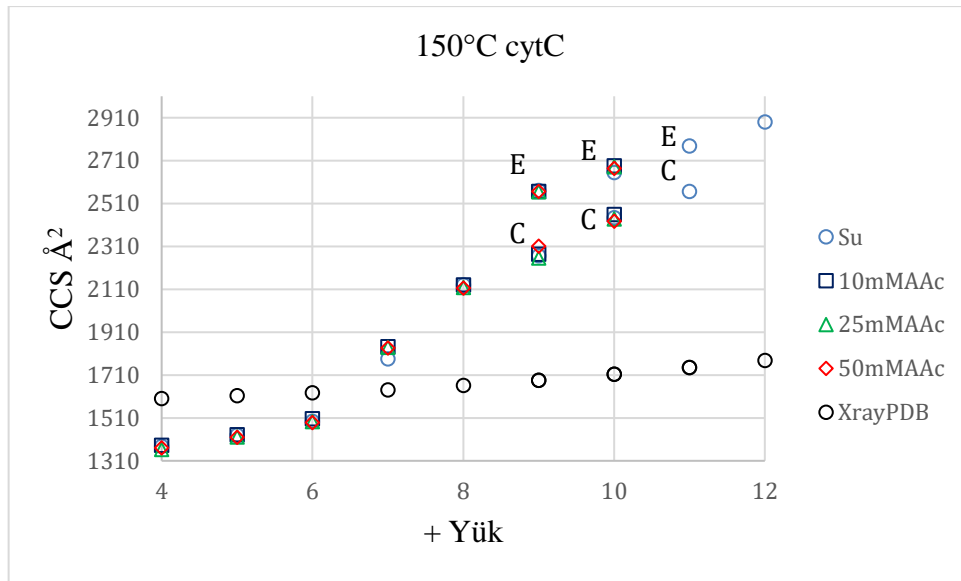
Yukarıda bahsedilen durum sitokrom c-PSS etkileşimi için de geçerlidir. AAc derişiminin artışı ile birlikte CCS değerinde çok hafif bir artış görülmektedir (Şekil 4.34.).

4.5 Teorik ve Deneysel CCS çalışmaları



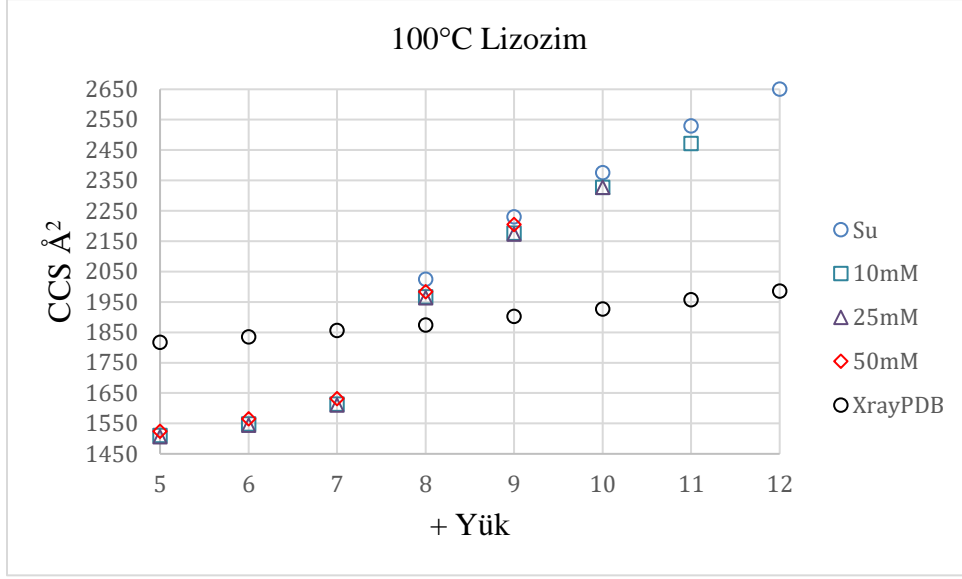
Şekil 4.35. 100 °C iyon kaynağı sıcaklığında sitokrom c proteininin farklı çözeltilerdeki yük durumuna bağlı CCS grafiği. (Konformerler, E=Geniş ve C=kompakt olmak üzere grafik üzerinde belirtilmiştir.)

Şekil 4.35.'de görüldüğü üzere, 100 °C iyon kaynağı sıcaklığında sitokrom c proteini için elde edilen CCS değerleri, teorik değerlere göre çok daha fazla fark göstermiştir. Ayrıca amonyum asetat ve su koşulları arasında da farklar görülmektedir. IMOS programındaki teorik değerler, kulombik itişmelerin etkisini detaylı olarak açıklayamamıştır.



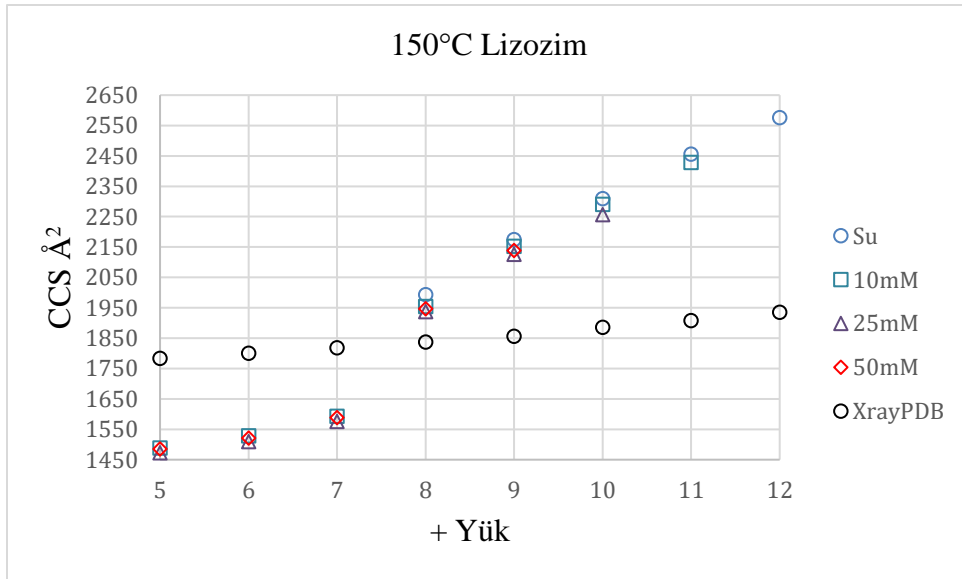
Şekil 4.36. 150 °C iyon kaynağı sıcaklığında sitokrom c proteininin farklı çözeltilerdeki yük durumuna bağlı CCS grafiği. (Konformerler, E=Geniş ve C=kompakt olmak üzere grafik üzerinde belirtilmiştir.)

150°C iyon kaynağı sıcaklığında sitokrom c proteini için sadece sıcaklıkla ortam koşulları sertleştirildiğinde amonyum asetat ve su koşulları için elde edilen veriler arasındaki fark 100 °C ye göre azalmıştır. Bu durum, etkileşim çalışmalarında farklı maddelerin protein ile etkileşimlerinden kaynaklanabilecek durumlarda iki farklı maddenin protein ile etkileşim farkının daha iyi görülebilmesi için olabildiğince yumuşak koşullarda çalışılması gerektiğini göstermektedir (Şekil 4.36.).



Şekil 4.37. 100 °C iyon kaynağı sıcaklığında lizozim proteininin farklı çözeltilerdeki yük durumuna bağlı CCS grafiği. (Konformerler, E=Geniş ve C=kompakt olmak üzere grafikte belirtilmiştir.)

100 °C iyon kaynağı sıcaklığında lizozime ait grafiğe bakıldığında 7+ yükten 8+ yüke geçişte kulombik itişmelerin sonucunda yapının açıldığı görülmektedir (Şekil 4.37.). Amonyum asetat koşullarında elde edilen verilerin suda elde edilen verilerden farklı olduğu gözlenmiştir. Şekildeki grafikte IMOS programındaki teorik değerler, kulombik itişmelerin etkisini detaylı olarak açıklayamadığı görülmektedir.



Şekil 4.38. 150 °C iyon kaynağı sıcaklığında lizozim proteininin farklı çözeltilerdeki yük durumuna bağlı CCS grafiği. (Konformerler, E=Geniş ve C=kompakt olmak üzere grafikte belirtilmiştir.)

150°C iyon sıcaklığında bile lizozim proteini için sitokrom c ye göre su ve amonyum asetat koşullarında elde edilen verilerin farkı her ne kadar azalsa da kaybolmamıştır. Bu durumun yapının yüksek sıcaklıklarda dahi bütünlüğünü kısmen koruyabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 4.38.).

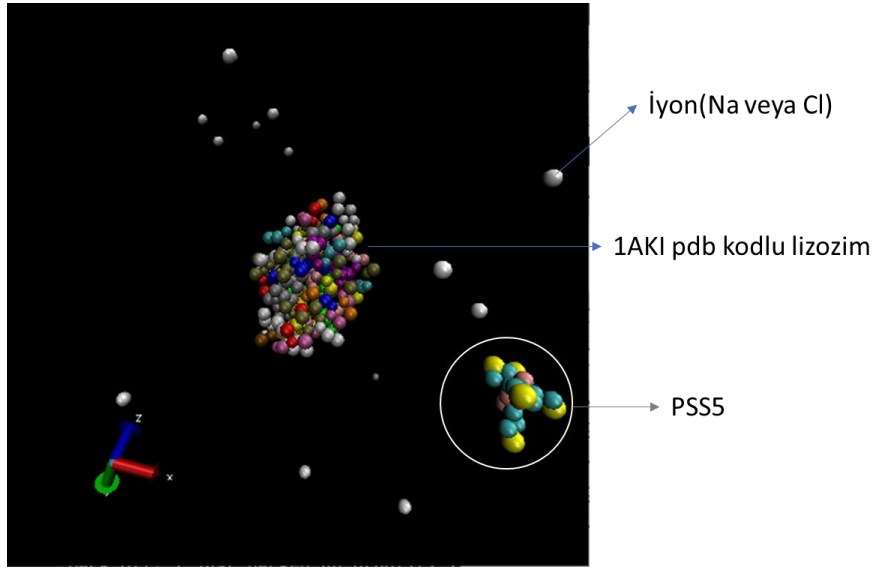
İyonlar yüksek sıcaklıkta çarpışmaların enerjisi arttığından dolayı daha hızlı hareket eder. Sıcaklık azaldıkça çarpışma kesiti artar, çünkü iyon ve gaz arasındaki uzun menzilli etkileşimler daha düşük hızlarda daha önemli hale gelir. Daha fazla etkileşim, daha uzun sürüklenme süresi anlamına gelir [125].

Çok yüksek sıcaklıklarda bunun tersi geçerlidir. Bir gaz molekülünün iyonu sıyırdığı etkileşimler, etkileşimin gerçekleşmesi için daha az zaman olduğundan daha az etkiye sahip olacaktır. Sıcaklık arttıkça, CCS sert küre sınırına yaklaşacaktır [125]. Bu etkileşimler, kullanılan gaza ve ayrıca iyona bağlıdır. Örneğin, protein yapıları çok yüksek sıcaklıklarda açılabilir.

4.6. Moleküler Dinamik Simülasyonu çalışmaları

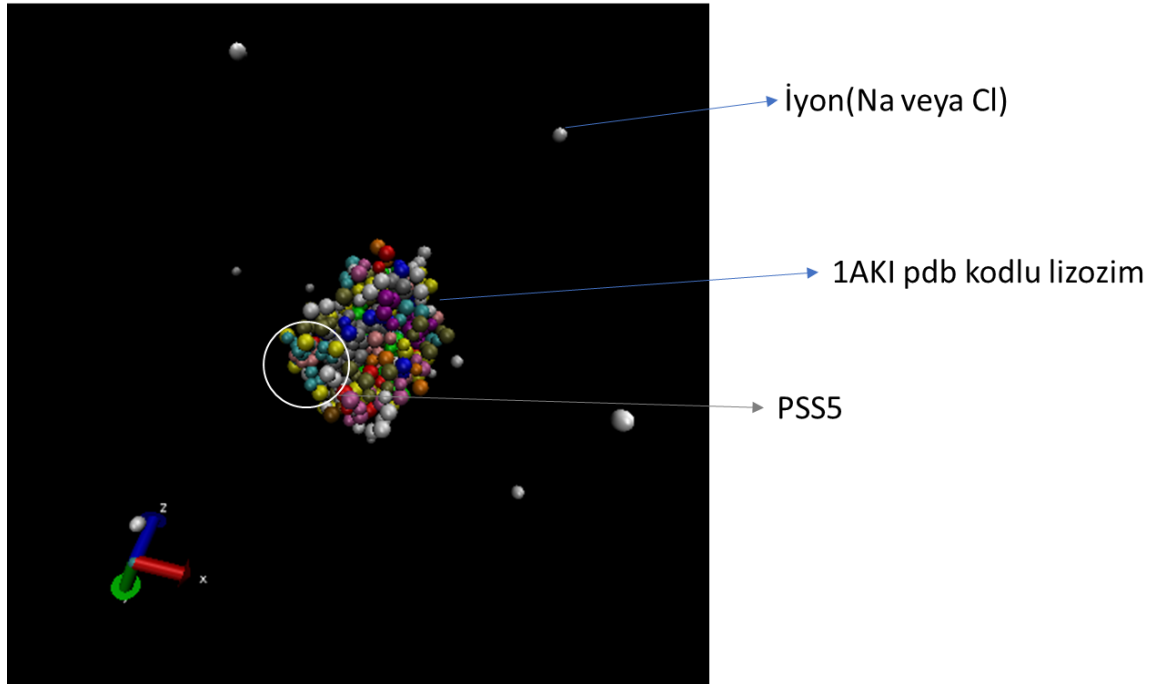
ESI sisteminden püskürtülen damlacıkların buharlaşmasıyla gaz fazının kaotik ortamından kaynaklı olarak birçok durum meydana gelmektedir. Bu yüzden dolayı yapılan deneysel verilerin sonuçlarının teorik olarak moleküler dinamik simülasyonları yapılarak kıyaslanması, süregelen ve son zamanlarda bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle hızla artan çalışmalardır [122, 126–128]. Bu çalışmada da farklı bir yaklaşım uygulanmaya çalışılmıştır. Yeni çıkan Martini3 [106] FF ile CG tekniklerinden faydalanarak çok daha hızlı bir şekilde, hesaplamaların sıradan masaüstü bilgisayarlarda dahi yapılabileceği gösterilmiştir.

4.6.1. Çözelti Fazı Simülasyonu



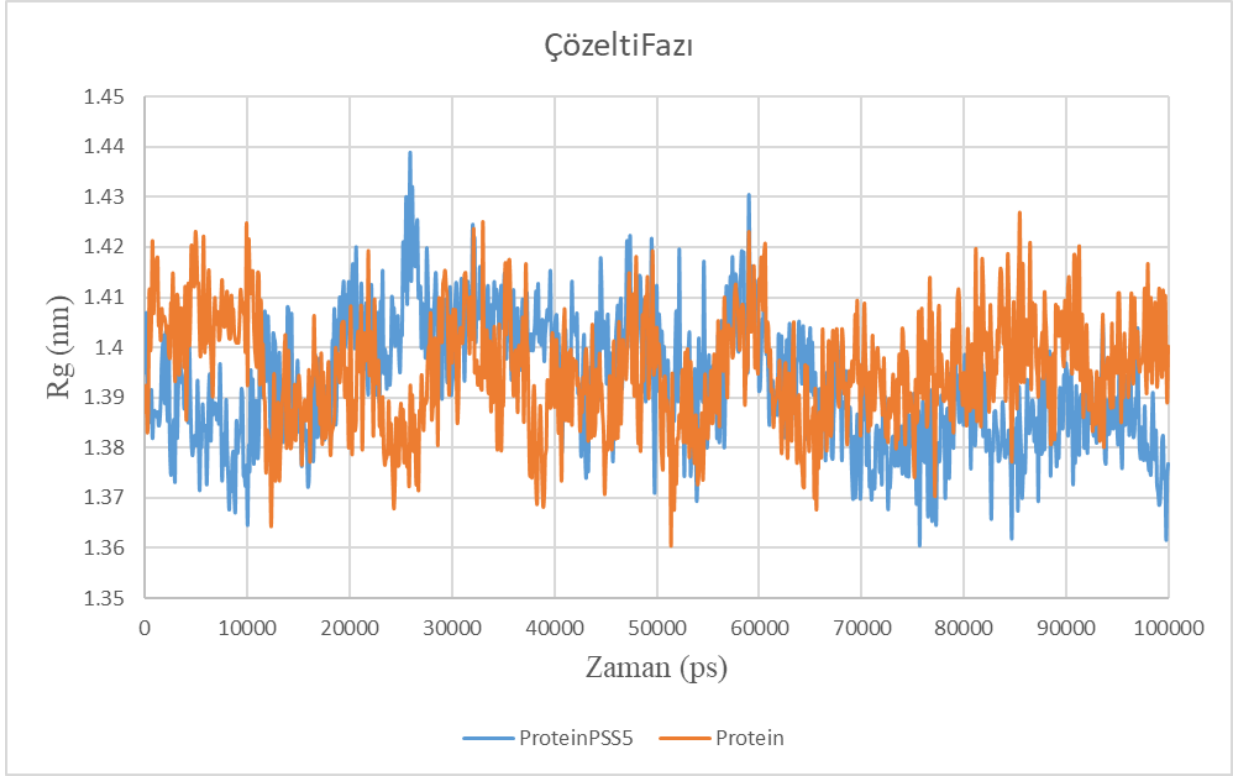
Şekil 4.39. Su molekülleri gösterilmeyen sistemde PSS5 ve 1AKI VMD [129] programı kullanılarak resmedilmiş sistemin başlangıç görüntüsü.

Şekil 4.39.'da görüldüğü üzere simülasyon PSS5 zinciri çözelti içerisinde lizozim proteininden farklı konumda iken başlatılmıştır (Şekilde su molekülleri gösterilmemiştir)



Şekil 4.40. 100ns sonundaki PSS5-protein kompleksinin görüntüsü.

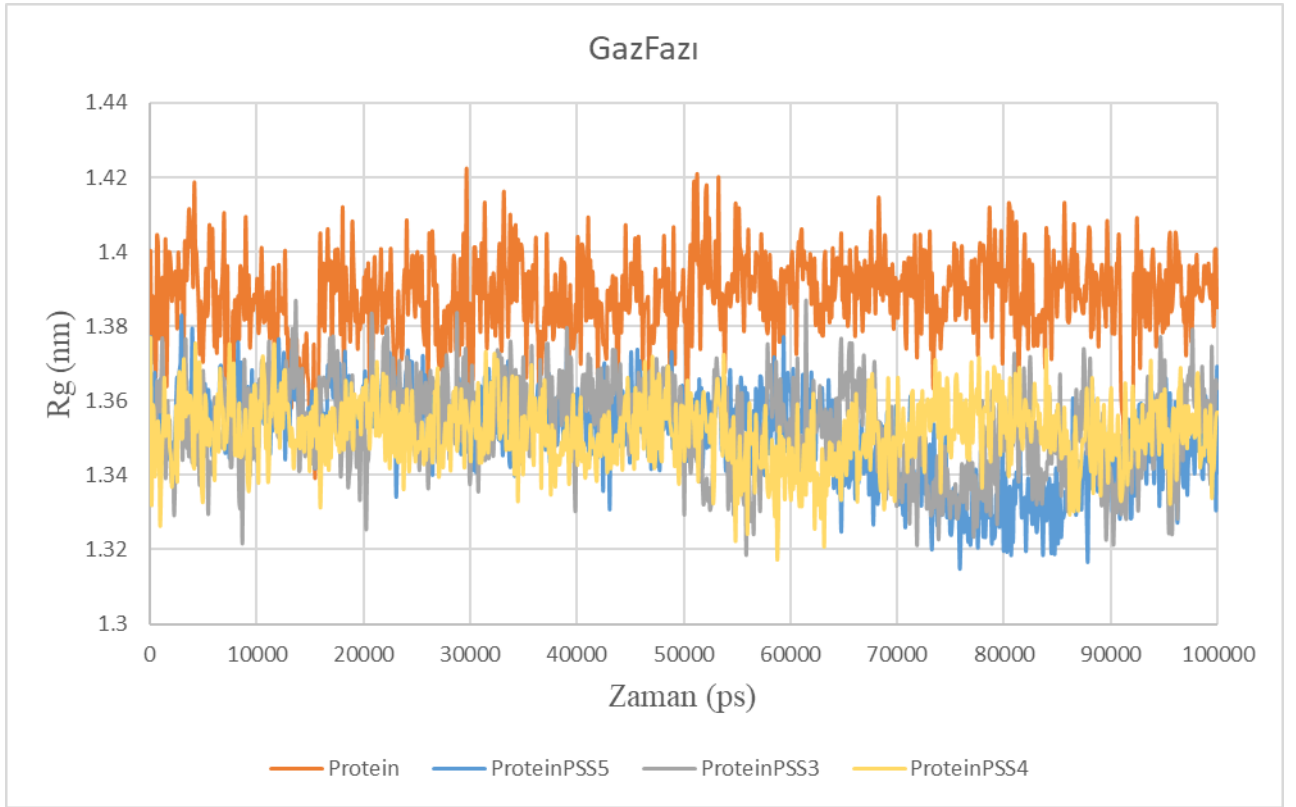
100 ns simülasyon sonunda PSS5 zincirinin lizozime bağlarak yapının daha kompakt hali görünmektedir (Şekil 4.40.). Bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi için sadece görsel değil aynı zamanda kompaktlığın göstergesi olan R_g [105] verisi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 4.41. Proteinin (turuncu) ve Protein-PSS5 kompleksinin (mavi) çözeltide 100ns sonucundaki R_g değerleri.

Çözelti fazında yürütülen simülasyonun sonunda elde edilen R_g değerleri göz önünde bulundurulduğunda protein-PSS5 kompleksinin oluşumu ile birlikte yapının bir miktar kapandığı belirlenmiştir (Şekil 4.41.).

4.6.2. Çözeltilerden Gaz Fazına Alınan Kompleksin Simülasyonu



Şekil 4.42. Proteinin (turuncu) ve Protein-PSS3-4-5 (gri-sarı-mavi) komplekslerinin vakumda 100ns sonucundaki Rg değerleri.

Lizozimin yapıya bağlandıktan sonra gaz fazında gerçekleştirilen simülasyonunun sonucunda elde edilen Rg değerlerine bakıldığında proteine kıyasla kompleks yapılarının çok daha fazla kapandığı görülmüştür (Şekil 4.42.). Bunun nedeni, vakum ortamdaki düşük dielektrik sabiti ve suyun bulunmamasıdır. Vakum ortamda su olmadığı için PSS zincirlerinin proteinle daha fazla etkileşime girebilmesi, yapının daha fazla kapanmasındaki ana etmendir. PSS ligand olarak düşünüldüğünde proteine yük dengesi sağlayarak ve protein yüzeyindeki pozitif yükleri kendisine doğru çekerek proteine kompakt bir yapı sağlamıştır.

Çizelge 4.1. 7+ yükte lizozim proteininin ve PSS3-4-5 komplekslerinin Rg değerleri çizelgesi. Çizelgede ilk 1ns ve son 100ns arasındaki seçili veriler sunulmaktadır.

ortalamağyration	1.392439	1.395231	1.38762	1.350384	1.35157	1.352811
netyük	0	0	7	7	7	7
proteinyük	8	8	7	12	11	10
PSSmer	5	0	0	5	4	3
Faz	Çözelti	Çözelti	Gaz	Gaz	Gaz	Gaz
0	1.39485	1.38705	1.40026	1.37709	1.37706	1.37707
100	1.40687	1.39237	1.37023	1.34131	1.33223	1.35007
200	1.39354	1.383	1.3879	1.35571	1.35891	1.35132
300	1.3896	1.38879	1.38027	1.3534	1.35769	1.35129
400	1.38872	1.41146	1.3869	1.36742	1.34022	1.35688
500	1.38495	1.39945	1.36663	1.3451	1.34504	1.34341
600	1.39145	1.40645	1.40423	1.3609	1.35098	1.36502
700	1.38186	1.42125	1.40176	1.35558	1.35465	1.35695
800	1.38686	1.40705	1.37707	1.34553	1.34904	1.36503
900	1.38734	1.41202	1.38483	1.36545	1.32666	1.35699
1000	1.38628	1.41454	1.37693	1.36342	1.33808	1.36714
99000	1.37109	1.39628	1.39201	1.34365	1.3559	1.35987
99100	1.36845	1.4114	1.39682	1.35017	1.35024	1.35718
99200	1.369	1.40852	1.38928	1.35658	1.34399	1.34106
99300	1.374	1.39912	1.38752	1.35458	1.35887	1.33774
99400	1.38147	1.39456	1.39376	1.34515	1.33457	1.37446
99500	1.38225	1.41143	1.38657	1.3536	1.34078	1.34919
99600	1.37374	1.39563	1.38039	1.34449	1.34208	1.34104
99700	1.37436	1.41033	1.40041	1.35707	1.3491	1.3566
99800	1.36146	1.39779	1.40066	1.33043	1.35573	1.36541
99900	1.37407	1.38897	1.3854	1.36903	1.35698	1.36329
100000	1.37673	1.40023	1.3888	1.3406	1.35701	1.36423

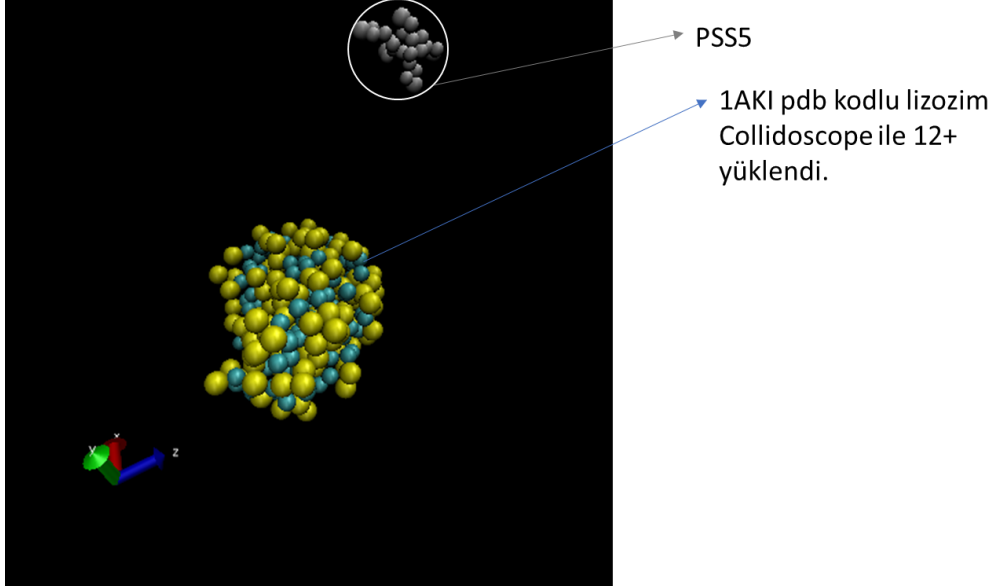
Net yükü 7+ olan lizozim-PSS5 iyonun simülasyonun son kısmındaki ve ortalama Rg farkı düşüktür. Daha uzun simülasyon sürelerinde PSS zincirlerinin bağlanma etkisi ile proteinin kompaktlaşma farkının artması beklenmektedir.

Net yükü 7+ olan PSS3-4-5 zincirlerini içeren kompleks iyonları için protein yapısının kapanma miktarları PSS zincir uzunluklarının artmasıyla artış göstermektedir.

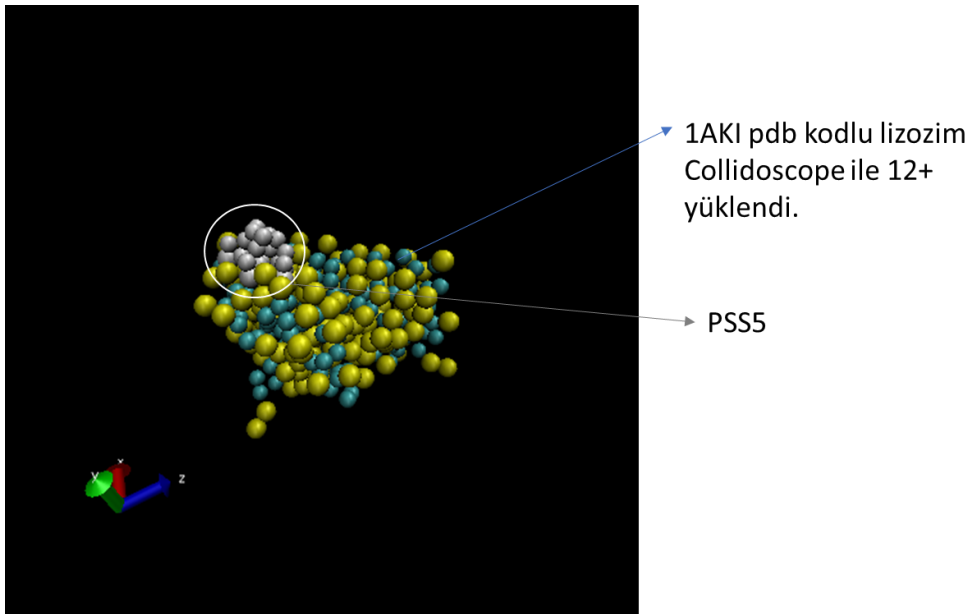
Listelenen tüm PSS-protein kompleks yapıları sadece protein ile kıyaslandığında yapıyı belirgin bir fark ile kompaktlaştırmaktadır.

4.6.3. Sadece Gaz Fazının Simülasyonu

Sadece vakum ortamında yapılan simülasyonlar olayın sadece gaz fazında gerçekleşmediğini çözelti fazındaki kompleksin önemini de göstermektedir.



Şekil 4.43. Çözelti fazından vakum ortama alınan lizozim molekülü 12+ yüklenerek yanına PSS5 molekülü konulan simülasyonun başlangıcı.



Şekil 4.44. 100ns simülasyon sonunda PSS5 proteine spesifik olmayan bir bölgeden bağlanması.

Çizelge 4.2. Vakum ortamda PSS5 in proteine özgün bölgeden bağlanmaması sonucu Rg değerleri. (İlk 1ns ve son 100ns gösterilmiştir.)

ortalama gyration	1.402761	1.388793
net yük	7	7
protein yük	12	7
PSSmer	5	0
Faz	Gaz	Gaz
0	1.40016	1.40026
100	1.40737	1.40315
200	1.42446	1.39489
300	1.41842	1.38736
400	1.40213	1.39706
500	1.42854	1.3784
600	1.41013	1.39165
700	1.40167	1.39177
800	1.41455	1.3868
900	1.39704	1.39031
1000	1.4058	1.38406
99000	1.41638	1.3918
99100	1.40767	1.38876
99200	1.39545	1.38298
99300	1.399	1.377
99400	1.40794	1.41084
99500	1.40782	1.38787
99600	1.40329	1.38961
99700	1.39026	1.39334
99800	1.40183	1.36344
99900	1.4036	1.4053
100000	1.40248	1.37517

Çözeltiden gaz fazına geçen 12+ yüklü lizozim iyonuna vakum ortamda PSS5 takılması (kompleks net yükü 7+) ile ilgili olarak tez kapsamında yapılan birçok simülasyonda yapının bazen açıldığı veya vakum ortamda PSS zincirinin protein üzerine kovalent olmayan etkileşimlerle protein yüzeyindeki bazı bölgelere tutunarak yapıyı kapattığı görülmüştür. Bu bölgelerin farklılığına bağlı olarak yapının açılarak, sadece proteinin 7+ yüklü Rg değerine göre yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2.). Bu sonuçlar, kompleks oluşumunun sadece gaz fazında gerçekleşmediğini düşündürmektedir. Eğer öyle olsaydı CCS değerlerinin yüksek olduğu noktalarda hatırı sayılır seviyede görmeye devam etmemiz gerekirdi. Çözeltide lizozim-PSS ve cytC-PSS komplekslerinin etkileşimleri ile ilgili bilgiler literatürde mevcuttur [130].

5. SONUÇLAR

- MS'de sıklıkla kullanılan amonyum asetatın, derişimlerinin değişmesi dahi multimer oluşumuna ve CCS değerleri üzerine etkisi bulunmaktadır.
- Farklı yüklerde ve sıcaklıklarda farklı etkiler gözlemlendiği için AAC derişiminin değişimine ait grafikte sıcaklık, yük ve protein türüne bağlı olarak herhangi bir korelasyon bulunamamıştır. Literatürde de bununla ilgili başka çalışmalar mevcuttur [127].
- AAC belirli derişimlerde multimer oluşumuna izin verirken derişimin fazlalığında ise proteinlerin arasına girerek multimer oluşumunu engellemektedir.
- MS iyon kaynağı sıcaklığının arttırılması yumuşak iyonlaştırmayı azaltarak amonyum asetat derişim miktarındaki etkilerinin azalmasına sebep olmuştur.
- Proteinin 60 °C 12 saat ısıtılması sonucu bozulma görülmemiştir. (Proteinin tekrar katlanması sonucu eski yapısına yakın bir sonuç vermiş olabilir ve çalışılan cihaz koşullarında bunun tespit edilemediği düşünölmektedir.)
- Su, asetonitril-su, metanol (MeOH), metanol-su 3 kV ve 100 °C yapılan analizlerde metanolün yapıyı denatüre ettiği ve bunun cihaz üzerinden tespiti mümkündür. Diğer çözelti ortamlarındaki değişiklikler çok daha azdır.
- Sitokrom c proteininde pH değişimleri sadece 7+ yükte anlamlı etkiler göstermiş ve pH yükseldikçe (sitokrom c pI noktasına ilerledikçe) CCS değerinin yüksek olduğu bölgede protein konformer miktarı azalmıştır.
- PSS-protein etkileşimlerinde PSS nin her monomerinin artışında 7+ ve 8+ yüklü iyonların yapısını kapattığı görölmüştür. PSS-protein komplekslerinin çözelti fazında da göröldüğü bilinmektedir [130].
- PSS-protein etkileşiminde AAC derişiminin artmasıyla birlikte yapıların kapanma miktarları azalmıştır [33]. Bu durumun gaz fazındaki PSS zincirinin AAC ile daha fazla etkileşimi ve aynı zamanda proteinin üzerinde bulunan pozitif yüklerinin AAC tarafından yük dengesi sağlanması sonucunda PSS nin karşıt iyon etkisinin azalmasından kaynaklı olarak CCS değerinin arttığı düşünölmektedir.
- PSS-protein etkileşimlerinde her ne kadar yüksek yüklerde yapının kapanmadığı belirtilmesine rağmen, sitokrom c 11+ yüklü dimerinde PSS monomer takılma sayısı arttııkça yapı daha fazla kapanmaktadır. Bu durum toplam yük sayısından

ziyade her bir protein üzerinde toplam yük miktarının daha etken olduğunu göstermektedir.

- Protein-PSS etkileşimlerinde pik tepe noktası bakımından sitokrom c ve lizozim her ne kadar birbirine benzer oranlarda kapanmasına rağmen, PSS nin sitokrom c yi kapatması çok daha kompakt konformerlerin oluşumunu sağlamaktadır. Sitokrom c için CCS azaldığı yönde konformer dağılımı oluşmuş ve her PSS eklenmesinde de kapanma artmıştır. Lizozimde bu durum konformerlerin var olduğu bölgelere doğru CCS azalması yönünde kayma şeklindedir. Kısaca sitokrom c kompaktlaşma miktarı daha fazladır. Lizozimin disülfid bağlarının yapayı koruduğu düşünülmektedir.
- Lizozimin simülasyonlarında 7+ yüküne PSS3-4-5 takılması sonucu PSS5 in yapayı daha fazla kapattığı görülmüştür. Bu durumun önce çözelti fazında sonrasında gaz fazına protein-PSS kompleksi şeklinde geçerek gaz fazında yüklendiği düşünülmektedir.
- GROMACS PSS-lizozim simülasyonları gaz fazına taşındığında yapının çözelti fazına kıyasla daha fazla kapandığı görülmüştür. Çözelti fazında PSS'nin sülfonat gruplarının protein, su ve sodyum iyonu ile etkileştiği düşünülmektedir. Ancak gaz fazında suyun ve sodyum iyonlarının yokluğundan kaynaklı protein üzerindeki yükleri kendisine daha fazla çekerek yapayı etkilediği düşünülmektedir.
- Martini modellemesinde sitokrom c için HEC ligandı Martini3 FF tarafından tanımlanamamıştır, bundan dolayı simülasyonları gerçekleştirilememiştir. HEC ligandı çıkarılarak yapılan simülasyonlarda vakum ortamda sitokrom c ligandın olmayışından kaynaklı protein içe doğru kapanma yapmıştır. PSS eklenmesi yapayı daha fazla kapatmak yerine açmıştır. Bu yüzden dolayı simülasyonların titizlikle hazırlanıp olabildiğince gerçekçi modellenmesi önemlidir.
- IMOS programı, X-ışını PDB dosyalarında sıcaklık artışı ile birlikte CCS değerinin düşmesi gerektiğini açıklamıştır ancak kulombik itişmeleri detaylı olarak açıklayamamaktadır. Yük arttıkça CCS arttığına dair bir bilgi sunmaktadır. Değerlerin gerçeğe yakın olabilmesi için moleküler simülasyonlardan yararlanılması gerekir. Bu şekilde X-ışını dosyaları kullanılarak CCS kıyaslamaları simülasyonlar yapılmadan da literatürde gösterilmektedir [112, 113, 131].

- ESI-MS'de çok kullanılan AAc tuzunun etkileri incelenmiş ve yakın zamanda bütün atom damlacık modellemesi yapılarak gaz fazı simülasyonları planlanmıştır. IMOS programı ile proteinlerin sıcaklık ve yüke bağlı teorik CCS değerleri deneysel verilerle kıyaslanmıştır. Ancak sadece bir programın (örneğin IMOS programı) kendi başına tüm her şeyi açıklayamadığı görülmüştür. Bu yüzden dolayı kuantum yarı-deneysel metot kullanılarak (PM7 [132]) teorik hesaplamalar ile yüke bağlı olarak yapıdaki açılmanın açıklamasının yapılması planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] C. Larriba, C.J. Hogan, Free molecular collision cross section calculation methods for nanoparticles and complex ions with energy accommodation, *J. Comput. Phys.* 251 (2013) 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.jcp.2013.05.038>.
- [2] S.H. Chen, D.H. Russell, How Closely Related Are Conformations of Protein Ions Sampled by IM-MS to Native Solution Structures?, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 1433–1443. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1191-1>.
- [3] K.A. Dill, Dominant Forces in Protein Folding, *Biochemistry.* 29 (1990) 7133–7155. <https://doi.org/10.1021/bi00483a001>.
- [4] O.O. Sogbein, D.A. Simmons, L. Konermann, Effects of pH on the kinetic reaction mechanism of myoglobin unfolding studied by time-resolved electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 312–319. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(99\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00149-X).
- [5] L. Konermann, D.J. Douglas, Acid-Induced Unfolding of Cytochrome c at Different Methanol Concentrations: Electrospray Ionization Mass Spectrometry Specifically Monitors Changes in the Tertiary Structure, *Biochemistry.* 36 (1997) 12296–12302. <https://doi.org/10.1021/bi971266u>.
- [6] P.J. Wright, J. Zhang, D.J. Douglas, Conformations of Gas-Phase Ions of Ubiquitin, Cytochrome c, Apomyoglobin, and β -Lactoglobulin Produced from Two Different Solution Conformations, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1906–1913. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.07.018>.
- [7] R.R. Hudgins, J. Woenckhaus, M.F. Jarrold, High resolution ion mobility measurements for gas phase proteins: correlation between solution phase and gas phase conformations, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 165–166 (1997) 497–507. [https://doi.org/10.1016/S0168-1176\(97\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1176(97)00182-1).
- [8] T. Wyttenbach, M.T. Bowers, Structural stability from solution to the gas phase: Native solution structure of ubiquitin survives analysis in a solvent-free ion mobility-mass spectrometry environment, *J. Phys. Chem. B.* 115 (2011) 12266–12275. <https://doi.org/10.1021/jp206867a>.
- [9] E. van Duijn, Current limitations in native mass spectrometry based structural biology, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21 (2010) 971–978. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.12.010>.
- [10] J.D. Barr, L. Shi, D.H. Russell, D.E. Clemmer, A.E. Holliday, Following a folding transition with capillary electrophoresis and ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 10933–10939. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02424>.

- [11] J.A. Silveira, K.L. Fort, D. Kim, K.A. Servage, N.A. Pierson, D.E. Clemmer, D.H. Russell, From Solution to the Gas Phase: Stepwise Dehydration and Kinetic Trapping of Substance P Reveals the Origin of Peptide Conformations, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 19147–19153. <https://doi.org/10.1021/ja4114193>.
- [12] Protein yapıları, (n.d.). [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_structure_\(full\).png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_structure_(full).png) (Erişim Tarihi : 3 Mayıs 2022).
- [13] R.W. Carrell, D.A. Lomas, Conformational disease, *Lancet.* 350 (1997) 134–138. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02073-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02073-4).
- [14] L.L. Parker, A.R. Houk, J.H. Jensen, Cooperative hydrogen bonding effects are key determinants of backbone amide proton chemical shifts in proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 9863–9872. <https://doi.org/10.1021/ja0617901>.
- [15] A.C. B., Principles that Govern the Folding of Protein Chains, *Science* (80-.). 181 (1973) 223–230. <https://doi.org/10.1126/science.181.4096.223>.
- [16] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A.A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature.* 596 (2021) 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- [17] F.U. Hartl, Protein Misfolding Diseases, *Annu. Rev. Biochem.* 86 (2017) 21–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044518>.
- [18] D.A. Skoog Crouch, Stanley R., Holler, F. James., Principles of instrumental analysis., Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA, 2007.
- [19] M.S. Kelly, C.N. Price, The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function, *Curr. Protein Pept. Sci.* 1 (2000) 349–384. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1389203003381315>.
- [20] J.R. Lakowicz, ed., Introduction to Fluorescence BT - Principles of Fluorescence Spectroscopy, in: Springer US, Boston, MA, 2006: pp. 1–26. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_1.
- [21] X.-D. Su, H. Zhang, T.C. Terwilliger, A. Liljas, J. Xiao, Y. Dong, Protein Crystallography from the Perspective of Technology Developments, *Crystallogr. Rev.* 21 (2015) 122–153. <https://doi.org/10.1080/0889311X.2014.973868>.
- [22] O. Cala, F. Guillière, I. Krimm, NMR-based analysis of protein–ligand interactions, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 943–956. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6931-0>.

- [23] K. Wüthrich, M. Billeter, P. Güntert, P. Luginbühl, R. Riek, G. Wider, NMR studies of the hydration of biological macromolecules, *Faraday Discuss.* 103 (1996) 245–253. <https://doi.org/10.1039/FD9960300245>.
- [24] V.M. Unger, Electron cryomicroscopy methods, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 548–554. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00260-8](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00260-8).
- [25] L. Urnavicius, K. Zhang, A.G. Diamant, C. Motz, M.A. Schlager, M. Yu, N.A. Patel, C. V Robinson, A.P. Carter, The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein, *Science.* 347 (2015) 1441–1446. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4080>.
- [26] G.W. Bushnell, G. V Louie, G.D. Brayer, High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c, *J. Mol. Biol.* 214 (1990) 585–595. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90200-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90200-6).
- [27] SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing, in: Association for Computing Machinery, New York, NY, USA, 2006.
- [28] Y.-L.P. Ow, D.R. Green, Z. Hao, T.W. Mak, Cytochrome c: functions beyond respiration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 532–542. <https://doi.org/10.1038/nrm2434>.
- [29] H. Berman, K. Henrick, H. Nakamura, Announcing the worldwide Protein Data Bank, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10 (2003) 980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>.
- [30] T. Ganz, LYSOZYME, in: G.J. Laurent, S.D.B.T.-E. of R.M. Shapiro (Eds.), Academic Press, Oxford, 2006: pp. 649–653. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00228-3>.
- [31] M.C. Stuart, R. de Vries, H. Lyklema, Chapter 2 - Polyelectrolytes, in: J.B.T.-F. of I. and C.S. Lyklema (Ed.), *Soft Colloids*, Academic Press, 2005: pp. 2.1-2.84. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-5679\(05\)80006-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-5679(05)80006-6).
- [32] H. Morawetz, W.L. Hughes, The interaction of proteins with synthetic polyelectrolytes. I. Complexing of bovine serum albumin, *J. Phys. Chem.* 56 (1952) 64–69. <https://doi.org/10.1021/j150493a014>.
- [33] E. Seyrek, P.L. Dubin, C. Tribet, E.A. Gamble, Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 273–282. <https://doi.org/10.1021/bm025664a>.
- [34] A.B. Kayitmazer, E. Seyrek, P.L. Dubin, B.A. Staggemeier, Influence of Chain Stiffness on the Interaction of Polyelectrolytes with Oppositely Charged Micelles and Proteins, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 8158–8165. <https://doi.org/10.1021/jp034065a>.
- [35] J. Gummel, F. Boué, D. Clemens, F. Cousin, Finite size and inner structure controlled by electrostatic screening in globular complexes of proteins and polyelectrolytes, *Soft Matter.* 4 (2008) 1653–1664.

<https://doi.org/10.1039/B803773F>.

- [36] C. Yigit, M. Kanduč, M. Ballauff, J. Dzubiella, Interaction of Charged Patchy Protein Models with Like-Charged Polyelectrolyte Brushes, *Langmuir*. 33 (2017) 417–427. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03797>.
- [37] C.L. Cooper, P.L. Dubin, A.B. Kayitmazer, S. Turksen, Polyelectrolyte-protein complexes, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10 (2005) 52–78. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.007>.
- [38] F. Cousin, J. Gummel, D. Ung, F. Boué, Polyelectrolyte-protein complexes: Structure and conformation of each specie revealed by SANS, *Langmuir*. 21 (2005) 9675–9688. <https://doi.org/10.1021/la0510174>.
- [39] L.E. Bromberg, E.S. Ron, Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (1998). [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00121-X).
- [40] V.A. Izumrudov, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Polycomplexes - Potential for bioseparation, *Bioseparation*. (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1008007818765>.
- [41] T. Wytenbach, M.T. Bowers, Intermolecular Interactions in Biomolecular Systems Examined by Mass Spectrometry, *Annu. Rev. Phys. Chem.* (2007). <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104515>.
- [42] R. Aebersold, M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics., 422 (2003) 198.
- [43] J. Griffiths, A brief history of mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5678–5683. <https://doi.org/10.1021/ac8013065>.
- [44] I.D. R., M.N. E., D.A. L., C.R. Graham, Latent Fingerprint Chemical Imaging by Mass Spectrometry, *Science* (80-.). 321 (2008) 805. <https://doi.org/10.1126/science.1157199>.
- [45] J. Biele, S. Ulamec, Capabilities of Philae, the Rosetta Lander, *Space Sci. Rev.* 138 (2008) 275–289. <https://doi.org/10.1007/s11214-007-9278-z>.
- [46] TOF analizörü, (n.d.). [chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometers_\(Instrumentation\)/Mass_Analyzers_\(Mass_Spectrometry\)](http://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometers_(Instrumentation)/Mass_Analyzers_(Mass_Spectrometry)) (Erişim Tarihi : 7 Mayıs 2022).
- [47] E. de. Hoffmann Stroobant, Vincent., *Mass spectrometry : principles and applications.*, Wiley, Chichester; New York, 2001.
- [48] E. de. Hoffmann Stroobant, Vincent., *Mass spectrometry : principles and applications*, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ, 2007.
- [49] W. Bleakney, A New Method of Positive Ray Analysis and Its Application to the Measurement of Ionization Potentials in Mercury Vapor, *Phys. Rev.* 34 (1929)

- 157–160. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.34.157>.
- [50] M.S.B. Munson, F.H. Field, *Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction*, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 2621–2630. <https://doi.org/10.1021/ja00964a001>.
- [51] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2299–2301. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>.
- [52] W.C. Chang, L.C.L. Huang, Y.-S. Wang, W.-P. Peng, H.C. Chang, N.Y. Hsu, W. Bin Yang, C.H. Chen, Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited, *Anal. Chim. Acta.* 582 (2007) 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.08.062>.
- [53] J.B. Fenn, *Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture)*, *Angew. Chemie Int. Ed.* 42 (2003) 3871–3894. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200300605>.
- [54] S. Banerjee, S. Mazumdar, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*, *Int. J. Anal. Chem.* 2012 (2012) 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- [55] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*, *Science (80-.)*. 246 (1989) 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>.
- [56] A. Konijnenberg, A. Butterer, F. Sobott, *Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology*, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1834 (2013) 1239–1256. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.11.013>.
- [57] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 210–230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.
- [58] P. Kebarle, L. Tang, *From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry*, *Anal. Chem.* 65 (1993) 972A-986A. <https://doi.org/10.1021/ac00070a001>.
- [59] M. Gamero-Castaño, J.F. de la Mora, *Kinetics of small ion evaporation from the charge and mass distribution of multiply charged clusters in electrosprays*, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 790–803. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1096-9888\(200007\)35:7<790::AID-JMS21>3.0.CO;2-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1096-9888(200007)35:7<790::AID-JMS21>3.0.CO;2-7).
- [60] Lord Rayleigh, XX. *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*, London, Edinburgh, Dublin *Philos. Mag. J. Sci.* 14 (1882) 184–186. <https://doi.org/10.1080/14786448208628425>.
- [61] R. Guevremont, K.W.M. Siu, J.C.Y. Le Blanc, S.S. Berman, *Are the electrospray*

- mass spectra of proteins related to their aqueous solution chemistry?, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3 (1992) 216–224. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(92\)87005-J](https://doi.org/10.1016/1044-0305(92)87005-J).
- [62] J.A. Loo, C.G. Edmonds, H.R. Udseth, R.D. Smith, Effect of reducing disulfide-containing proteins on electrospray ionization mass spectra, *Anal. Chem.* 62 (1990) 693–698. <https://doi.org/10.1021/ac00206a009>.
- [63] M.A. Kelly, M.M. Vestling, C.C. Fenselau, P.B. Smith, Electrospray analysis of proteins: A comparison of positive-ion and negative-ion mass spectra at high and low pH, *Org. Mass Spectrom.* 27 (1992) 1143–1147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/oms.1210271028>.
- [64] R.L. Baldwin, How Hofmeister ion interactions affect protein stability, *Biophys. J.* 71 (1996) 2056–2063. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79404-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79404-3).
- [65] M.M. Zhu, D.L. Rempel, J. Zhao, D.E. Giblin, M.L. Gross, Probing Ca²⁺-Induced Conformational Changes in Porcine Calmodulin by H/D Exchange and ESI-MS: Effect of Cations and Ionic Strength, *Biochemistry.* 42 (2003) 15388–15397. <https://doi.org/10.1021/bi035188o>.
- [66] P. Pan, S.A. McLuckey, The Effect of Small Cations on the Positive Electrospray Responses of Proteins at Low pH, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5468–5474. <https://doi.org/10.1021/ac034344u>.
- [67] A.T. Iavarone, O.A. Udekwu, E.R. Williams, Buffer Loading for Counteracting Metal Salt-Induced Signal Suppression in Electrospray Ionization, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3944–3950. <https://doi.org/10.1021/ac049724+>.
- [68] G. Wang, R.B. Cole, Effect of Solution Ionic Strength on Analyte Charge State Distributions in Positive and Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3702–3708. <https://doi.org/10.1021/ac00093a026>.
- [69] H. Hernández, C. V Robinson, Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 715–726. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.73>.
- [70] L. Konermann, Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH “Buffer” for Native Electrospray Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 1827–1835. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1739-3>.
- [71] D.R. Lide, *CRC handbook of chemistry and physics*, CRC press, 2004.
- [72] J.B. Hedges, S. Vahidi, X. Yue, L. Konermann, Effects of ammonium bicarbonate on the electrospray mass spectra of proteins: evidence for bubble-induced unfolding, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6469–6476.
- [73] J. Li, C. Santambrogio, S. Brocca, G. Rossetti, P. Carloni, R. Grandori, Conformational effects in protein electrospray-ionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 35 (2016) 111–122. <https://doi.org/10.1002/mas.21465>.

- [74] J. V Iribarne, B.A. Thomson, On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2287–2294. <https://doi.org/10.1063/1.432536>.
- [75] N. Steve, F.J. B., Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 1111–1117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609969104>.
- [76] S. Consta, M.I. Oh, S. Soltani, Advances in the theoretical and molecular simulation studies of the ion chemistry in droplets, *Int. J. Mass Spectrom.* 377 (2015) 557–567. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.09.004>.
- [77] L. Konermann, E. Ahadi, A.D. Rodriguez, S. Vahidi, Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2–9. <https://doi.org/10.1021/ac302789c>.
- [78] L. Konermann, R.G. McAllister, H. Metwally, Molecular Dynamics Simulations of the Electrospray Process: Formation of NaCl Clusters via the Charged Residue Mechanism, *J. Phys. Chem. B.* 118 (2014) 12025–12033. <https://doi.org/10.1021/jp507635y>.
- [79] E. Aliyari, L. Konermann, Formation of Gaseous Proteins via the Ion Evaporation Model (IEM) in Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10807–10814. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02290>.
- [80] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, Molecular Beams of Macroions, *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240–2249. <https://doi.org/10.1063/1.1670391>.
- [81] X. Yue, S. Vahidi, L. Konermann, Insights into the Mechanism of Protein Electrospray Ionization From Salt Adduction Measurements, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25 (2014) 1322–1331. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0905-0>.
- [82] C.D. Daub, N.M. Cann, How Are Completely Desolvated Ions Produced in Electrospray Ionization: Insights from Molecular Dynamics Simulations, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8372–8376. <https://doi.org/10.1021/ac202103p>.
- [83] F. Lanucara, S.W. Holman, C.J. Gray, C.E. Eyers, The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics, *Nat. Chem.* 6 (2014) 281–294. <https://doi.org/10.1038/nchem.1889>.
- [84] D.R. Hernandez, J.D. DeBord, M.E. Ridgeway, D.A. Kaplan, M.A. Park, F. Fernandez-Lima, Ion dynamics in a trapped ion mobility spectrometer, *Analyst.* 139 (2014) 1913–1921. <https://doi.org/10.1039/c3an02174b>.
- [85] J.A. McLean, B.T. Ruotolo, K.J. Gillig, D.H. Russell, Ion mobility-mass spectrometry: A new paradigm for proteomics, in: *Int. J. Mass Spectrom.*, 2005: pp. 301–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2004.10.003>.
- [86] X. Liu, S.J. Valentine, M.D. Plasencia, S. Trimpin, S. Naylor, D.E. Clemmer, Mapping the Human Plasma Proteome by SCX-LC-IMS-MS, *J. Am. Soc. Mass*

- Spectrom. 18 (2007) 1249–1264. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.04.012>.
- [87] C.S. Hoaglund, S.J. Valentine, D.E. Clemmer, An Ion Trap Interface for ESI-Ion Mobility Experiments, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4156–4161. <https://doi.org/10.1021/ac970526a>.
- [88] P. Dwivedi, P. Wu, S.J. Klopsch, G.J. Puzon, L. Xun, H.H. Hill, Metabolic profiling by Ion Mobility Mass Spectrometry (IMMS), *Metabolomics*. 4 (2008) 63–80. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0093-z>.
- [89] F.A. Fernandez-Lima, C. Becker, A.M. McKenna, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, D.H. Russell, Petroleum crude oil characterization by IMS-MS and FTICR MS, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9941–9947. <https://doi.org/10.1021/ac901594f>.
- [90] M. Atakay, Investigation of Gas-Phase Characteristics of Model Synthetic Polymers and Their Complexes, 2016.
- [91] F.A. Fernandez-Lima, D.A. Kaplan, M.A. Park, Note: Integration of trapped ion mobility spectrometry with mass spectrometry, *Rev. Sci. Instrum.* 82 (2011) 12–15. <https://doi.org/10.1063/1.3665933>.
- [92] F. Fernandez-Lima, D.A. Kaplan, J. Suetering, M.A. Park, Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 14 (2011) 93–98. <https://doi.org/10.1007/s12127-011-0067-8>.
- [93] S.C. Henderson, S.J. Valentine, A.E. Counterman, D.E. Clemmer, ESI/ion trap/ion mobility/time-of-flight mass spectrometry for rapid and sensitive analysis of biomolecular mixtures, *Anal. Chem.* 71 (1999) 291–301. <https://doi.org/10.1021/ac9809175>.
- [94] A. Garabedian, P. Benigni, C.E. Ramirez, E.S. Baker, T. Liu, R.D. Smith, F. Fernandez-Lima, Towards Discovery and Targeted Peptide Biomarker Detection Using nanoESI-TIMS-TOF MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29 (2018) 817–826. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1787-8>.
- [95] K. Breuker, F.W. McLafferty, Stepwise evolution of protein native structure with electrospray into the gas phase, 10–12 to 102 s, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 18145–18152. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807005105>.
- [96] C. Ieritano, W.S. Hopkins, Assessing collision cross section calculations using MobCal-MPI with a variety of commonly used computational methods, *Mater. Today Commun.* 27 (2021) 102226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102226>.
- [97] M.F. Mesleh, J.M. Hunter, A.A. Shvartsburg, G.C. Schatz, M.F. Jarrold, Structural Information from Ion Mobility Measurements: Effects of the Long-Range Potential, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 16082–16086. <https://doi.org/10.1021/jp961623v>.
- [98] S. Ewing, M. Donor, J. Wilson, J. Prell, Collidoscope: An Improved Tool for

- Computing Collisional Cross-Sections with the Trajectory Method, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1594-2>.
- [99] V. D'Atri, M. Porrini, F. Rosu, V. Gabelica, Linking molecular models with ion mobility experiments. Illustration with a rigid nucleic acid structure, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 711–726. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.3590>.
- [100] J.E. Jones, S. Chapman, On the determination of molecular fields.—I. From the variation of the viscosity of a gas with temperature, *Proc. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. Phys. Character.* 106 (1924) 441–462. <https://doi.org/10.1098/rspa.1924.0081>.
- [101] J.E. Jones, S. Chapman, On the determination of molecular fields. —II. From the equation of state of a gas, *Proc. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. Phys. Character.* 106 (1924) 463–477. <https://doi.org/10.1098/rspa.1924.0082>.
- [102] Lennard-Jones Potansiyel fonksiyonunun grafiği, (n.d.). https://en.wikipedia.org/wiki/File:Graph_of_Lenanrd-Jones_potential.png (Erişim Tarihi : 19 Nisan 2022).
- [103] V. Shrivastav, M. Nahin, C.J. Hogan, C. Larriba-Andaluz, Benchmark Comparison for a Multi-Processing Ion Mobility Calculator in the Free Molecular Regime, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 1540–1551. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1661-8>.
- [104] Kütle merkezi, (n.d.). <https://www.khanacademy.org/science/physics/linear-momentum/center-of-mass/a/what-is-center-of-mass> (Erişim Tarihi : 20 Nisan 2022).
- [105] M.Y. Lobanov, N.S. Bogatyreva, O. V Galzitskaya, Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness, *Mol. Biol.* 42 (2008) 623–628. <https://doi.org/10.1134/S0026893308040195>.
- [106] P.C.T. Souza, R. Alessandri, J. Barnoud, S. Thallmair, I. Faustino, F. Grünwald, I. Patmanidis, H. Abdizadeh, B.M.H. Bruininks, T.A. Wassenaar, P.C. Kroon, J. Meler, V. Nieto, V. Corradi, H.M. Khan, J. Domański, M. Javanainen, H. Martinez-Seara, N. Reuter, R.B. Best, I. Vattulainen, L. Monticelli, X. Periole, D.P. Tieleman, A.H. de Vries, S.J. Marrink, Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics, *Nat. Methods.* 18 (2021) 382–388. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01098-3>.
- [107] Martini CG modelleri, (n.d.). <http://cgmartini.nl/index.php/2021-martini-online-workshop/tutorials/564-2-proteins-basic-and-martimize-2> (Erişim Tarihi: 18 Nisan 2022).
- [108] M.I. Mahmood, A.B. Poma, K. Okazaki, Optimizing Gō-MARTINI Coarse-Grained Model for F-BAR Protein on Lipid Membrane , *Front. Mol. Biosci.* . 8 (2021). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2021.619381>.

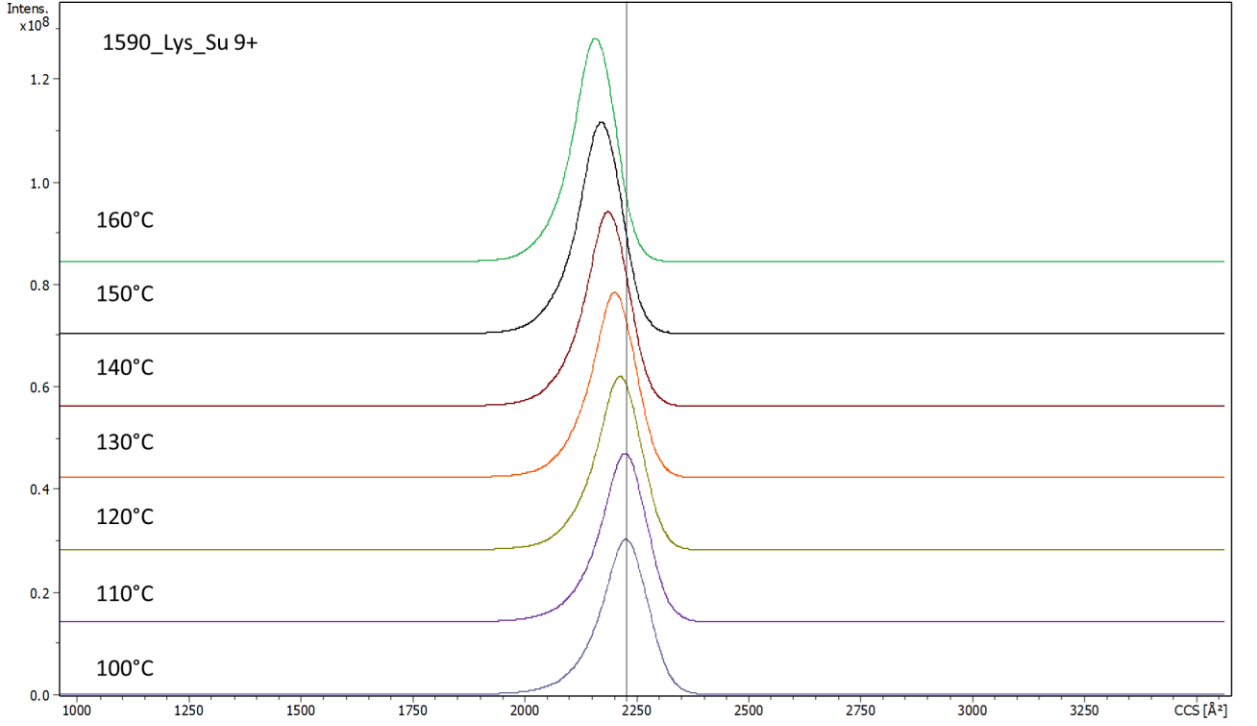
- [109] Sitokrom c Sigma-Aldrich, (n.d.).
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/264/402/c2867dat.pdf> (Erişim Tarihi : 17Nisan 2022).
- [110] Lizozim Sigma-Aldrich, (n.d.).
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/362/900/17651dat.pdf> (Erişim Tarihi : 17Nisan 2022).
- [111] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 1859–1865.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- [112] J.C. May, E. Jurneczko, S.M. Stow, I. Kratochvil, S. Kalkhof, J.A. McLean, Conformational landscapes of ubiquitin, cytochrome c, and myoglobin: Uniform field ion mobility measurements in helium and nitrogen drift gas, *Int. J. Mass Spectrom.* 427 (2018) 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2017.09.014>.
- [113] A.D. Rolland, L.S. Biberic, J.S. Prell, Investigation of Charge-State-Dependent Compaction of Protein Ions with Native Ion Mobility–Mass Spectrometry and Theory, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 33 (2022) 369–381.
<https://doi.org/10.1021/jasms.1c00351>.
- [114] J.E. Stone, D. Gohara, G. Shi, OpenCL: A Parallel Programming Standard for Heterogeneous Computing Systems, *Comput. Sci. Eng.* 12 (2010) 66–73.
<https://doi.org/10.1109/MCSE.2010.69>.
- [115] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX.* 1–2 (2015) 19–25.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- [116] Lindahl, Abraham, Hess, van der Spoel, GROMACS 2021.5 Source code, (2022).
<https://doi.org/10.5281/ZENODO.5850051>.
- [117] L.T. Su, S. Naffziger, M. Papermaster, Multi-chip technologies to unleash computing performance gains over the next decade, in: 2017 IEEE Int. Electron Devices Meet., 2017: pp. 1.1.1-1.1.8.
<https://doi.org/10.1109/IEDM.2017.8268306>.
- [118] W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers.* 22 (1983) 2577–2637. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bip.360221211>.
- [119] A.B. Poma, M. Cieplak, P.E. Theodorakis, Combining the MARTINI and Structure-Based Coarse-Grained Approaches for the Molecular Dynamics Studies of Conformational Transitions in Proteins, *J. Chem. Theory Comput.* 13 (2017) 1366–1374. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00986>.
- [120] F. Grünewald, R. Alessandri, P.C. Kroon, L. Monticelli, P.C.T. Souza, S.J.

- Marrink, PolyPy; a python suite for facilitating simulations of macromolecules and nanomaterials, *Nat. Commun.* 13 (2022) 68. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27627-4>.
- [121] M.L. Abramsson, C. Sahin, J.T.S. Hopper, R.M.M. Branca, J. Danielsson, M. Xu, S.A. Chandler, N. Österlund, L.L. Ilag, A. Leppert, J. Costeira-Paulo, L. Lang, K. Teilum, A. Laganowsky, J.L.P. Benesch, M. Oliveberg, C. V. Robinson, E.G. Marklund, T.M. Allison, J.R. Winther, M. Landreh, Charge Engineering Reveals the Roles of Ionizable Side Chains in Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *JACS Au.* 1 (2021) 2385–2393. <https://doi.org/10.1021/jacsau.1c00458>.
- [122] L. Konermann, H. Metwally, R.G. McAllister, V. Popa, How to run molecular dynamics simulations on electrospray droplets and gas phase proteins: Basic guidelines and selected applications, *Methods.* 144 (2018) 104–112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.010>.
- [123] S.K. Chowdhury, V. Katta, B.T. Chait, Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 9012–9013. <https://doi.org/10.1021/ja00180a074>.
- [124] D.P. Smith, T.W. Knapman, I. Campuzano, R.W. Malham, J.T. Berryman, S.E. Radford, A.E. Ashcroft, Deciphering Drift Time Measurements from Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry Studies, *Eur. J. Mass Spectrom.* 15 (2009) 113–130. <https://doi.org/10.1255/ejms.947>.
- [125] V. Gabelica, E. Marklund, Fundamentals of ion mobility spectrometry, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 42 (2018) 51–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.022>.
- [126] Y.K. Ng, N.N. Tajoddin, P.M. Scrosati, L. Konermann, Mechanism of Thermal Protein Aggregation: Experiments and Molecular Dynamics Simulations on the High-Temperature Behavior of Myoglobin, *J. Phys. Chem. B.* 125 (2021) 13099–13110. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c07210>.
- [127] R. Beveridge, L.G. Migas, R.K. Das, R. V Pappu, R.W. Kriwacki, P.E. Barran, Ion Mobility Mass Spectrometry Uncovers the Impact of the Patterning of Oppositely Charged Residues on the Conformational Distributions of Intrinsically Disordered Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 4908–4918. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b13483>.
- [128] D.J.D. Pimlott, L. Konermann, Using covalent modifications to distinguish protein electrospray mechanisms: Charged residue model (CRM) vs. chain ejection model (CEM), *Int. J. Mass Spectrom.* 469 (2021) 116678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijms.2021.116678>.
- [129] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

- [130] M. Andersson, P. Hansson, Binding of Lysozyme to Spherical Poly(styrenesulfonate) Gels, *Gels* . 4 (2018). <https://doi.org/10.3390/gels4010009>.
- [131] C. Bleiholder, F.C. Liu, M. Chai, Comment on Effective Temperature and Structural Rearrangement in Trapped Ion Mobility Spectrometry, *Anal. Chem.* 92 (2020) 16329–16333. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02052>.
- [132] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters, *J. Mol. Model.* 19 (2013) 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>.

EKLER

EK 1. İyon Sıcaklığının Etkisi



Şekil 4.45. Su içerisindeki lizozim proteininin farklı iyon kaynağı sıcaklıklarında ve 3.0 kV kapiler voltajında gerçekleştirilen TMS-TOF-MS cihazından alınan verilerin 9+ yüklü monomer iyonuna ait mobilogramları.

Lizozim 9+ sıcaklığa bağlı olarak CCS değeri azalmaktadır. Bu durum düşük yüklere kıyasla, yüksek yüklere daha iyi görülmektedir (Şekil 4.44.).

EK 2. Sitokrom c deneysel ve teorik CCS çizelgesi

Çizelge 4.3. Sitokrom c yüke ve sıcaklığa göre CCS değerleri.

Konformerler		Extended	Kompakt	E	K	E	K			6+ dimerle karışmış		
12360	1030	1123.6364	1123.6	1236	1236	1373.3	1373.333	1545	1765.714	2060	2472	3090
Yük	12	11	11	10	10	9	9	8	7	6	5	4
cytC-su												
100	3002	2887	2671	2754	2542	2669	2352	2208	1803	1552	1482	1421
110	2984	2864	2644	2733	2522	2648	2334	2192	1800	1539	1473	1411
120	2951	2835	2620	2708	2495	2624	2310	2170	1797	1525	1459	1397
130	2929	2816	2603	2688	2477	2605	2297	2156	1792	1512	1452	1389
140	2911	2797	2586	2673	2460	2588	2279	2143	1789	1504	1438	1379
150	2891	2779	2567	2655	2444	2571	2266	2130	1785	1494	1431	1378
cytC10mMAAc												
100 -	-	-	-	2706	2482	2622	2280	2146	1787	1518	1447	1396
110 -	-	-	-	2684	2508	2613	2306	2166	1787	1525	1455	1400
120 -	-	-	-	2728	2484	2619	2298	2163	1788	1529	1453	1395
130 -	-	-	-	2711	2485	2603	2275	2151	1790	1516	1449	1404
140 -	-	-	-	2685	2437	2564	2253	2114	1835	1493	1419	1374
150 -	-	-	-	2686	2459	2566	2274	2130	1842	1506	1432	1383
cytC25mMAAc												
100 -	-	-	-	2733	2479	2606	2334	2156	1796	1516	1449	1397
110 -	-	-	-	2693	2507	2628	2377	2170	1801	1525	1457	1395
120 -	-	-	-	2743	2478	2618	2291	2161	1799	1524	1453	1396
130 -	-	-	-	2714	2485	2603	2302	2151	1796	1514	1445	1393
140 -	-	-	-	2710	2459	2586	2323	2138	1792	1507	1434	1379
150 -	-	-	-	2681	2438	2565	2256	2119	1840	1493	1422	1363
cytC50mMAAc												
100 -	-	-	-	2715	2491	2626	2358	2159	1800	1520	1449	1394
110 -	-	-	-	2748	2493	2622	2290	2167	1801	1524	1458	1393
120 -	-	-	-	2743	2492	2618	2297	2162	1805	1521	1452	1396
130 -	-	-	-	2710	2467	2549	2276	2149	1796	1510	1444	1383
140 -	-	-	-	2706	2460	2587	2275	2133	1846	1503	1434	1379
150 -	-	-	-	2674	2428	2566	2311	2116	1837	1489	1420	1371
XRAY-1HRC pdb TMLJ												
100	1831	1791	1791	1757	1757	1726	1726	1696	1676	1658	1642	1629
110	1819	1783	1783	1747	1747	1718	1718	1689	1669	1651	1636	1620
120	1807	1775	1775	1740	1740	1708	1708	1682	1662	1645	1631	1614
130	1799	1763	1763	1732	1732	1703	1703	1676	1653	1640	1627	1609
140	1786	1755	1755	1724	1724	1694	1694	1669	1647	1632	1620	1604
150	1778	1746	1746	1714	1714	1686	1686	1662	1641	1627	1614	1600
suya göre 100derecede	48.458514	46.857631	39.444195	44.20306	36.52012	42.9124	30.70132	26.22951	7.300949	6.604361	10.24328	13.63934
%CCS teorik farkı		E	K	E	K	E	K					

Sitokrom c proteini için IMOS programı TMLJ yöntemi ile hesaplanan 1HRC X-ışını PDB (moleküler simülasyonu yapılmamış) dosyasına göre kıyaslanan verilerde CCS değerleri yüksek yükleri açıklayamamıştır. Bu yüzden teorik ile gerçek veri arasında 12+ yükünde %48.46 fark bulunmaktadır. Ancak düşük yükler daha doğal konformasyonlara sahip olduğundan ve kulombik itişmelerin düşük olduğu ortamdan kaynaklı X-ışını PDB dosyasına benzer (%13.64 fark) CCS değerlerine sahiptir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.4. Sitokrom c için iyon kaynağı sıcaklığının yükler üzerine etkisi (100 °C ve 150 °C kıyaslaması)

cytC		E	K	E	K	E	K						
Yük	12	11	11	10	10	9	9	8	7	6	5	4	
Su 100-150 arası %CCS	3.7671814	3.8122132	3.9709813	3.660566	3.931007	3.740458	3.724556	3.596127	1.003344	3.808273	3.501545	3.072526	
10mM sıcaklık				0.74184	0.930986	2.158828	0.263505	0.748363	3.031138	0.793651	1.042028	0.935588	
25mM sıcaklık				1.920946	1.667684	1.585767	3.398693	1.730994	2.420242	1.528747	1.880878	2.463768	
50mM sıcaklık				1.521618	2.561496	2.311248	2.013279	2.011696	2.034644	2.060485	2.02161	1.663653	
PDB sıcaklık	2.9371017	2.5445293	2.5445293	2.477672	2.477672	2.344666	2.344666	2.025015	2.110341	1.887367	1.719902	1.796222	

Sitokrom c proteini için 100 °C ve 150 °C arasındaki sıcaklık farkına bağlı olarak değişen CCS değerleri yüksek yüklerde teorik verilere yakın sonuçlar vermiştir. Sitokrom c düşük yüklerde bile sıcaklıktan etkilenmektedir. AAc eklenmesi ile sıcaklıktan kaynaklı CCS değişimleri azalmaktadır. Burada amonyum ve asetat iyonlarının protein etrafını sararak yük dengelemesi sağladığından yapının konformasyonel değişimine engel olduğu düşünülmektedir. 10 mM derişiminden daha yüksek AAc derişimlerinde tekrar yük dengesinin bozulmasından kaynaklı olarak protein iyonlarının AAc ile etkileşimine bağlı olarak sıcaklıktan etkilenme oranları artmıştır (Çizelge 4.4.).

EK 3. Lizozim deneysel ve teorik CCS çizelgesi

Çizelge 4.5. Lizozim yüke ve sıcaklığa göre CCS değerleri.

	14310	1192	1301	1431	1590	1788	2044	2385	2862
LYS-su		12	11	10	9	8	7	6	5
	100	2650	2529	2375	2230	2025	-	-	-
	110	2644	2523	2374	2228	2029	-	-	-
	120	2631	2511	2361	2217	2023	-	-	-
	130	2617	2495	2346	2206	2015	-	-	-
	140	2597	2474	2327	2190	2004	-	-	-
	150	2576	2456	2309	2175	1993	-	-	-
LYS10mMAAc									
	100	-	2471	2327	2176	1967	1614	1548	1510
	110	-	2486	2342	2194	1971	1625	1560	1515
	120	-	2489	2328	2189	1967	1626	1558	1518
	130	-	2470	2321	2178	1963	1621	1551	1510
	140	-	2453	2305	2166	1958	1608	1540	1502
	150	-	2429	2290	2152	1954	1593	1529	1489
LYS25mMAAc									
	100	-	-	2327	2173	1963	1610	1544	1506
	110	-	-	2330	2186	1979	1623	1558	1515
	120	-	-	2319	2164	1964	1603	1537	1499
	130	-	-	2310	2176	1967	1609	1549	1508
	140	-	-	2301	2160	1962	1599	1538	1497
	150	-	-	2257	2126	1938	1576	1510	1473
LYS50mMAAc									
	100	-	-	-	2205	1983	1631	1565	1524
	110	-	-	-	2163	1964	1603	1539	1498
	120	-	-	-	2194	1980	1623	1563	1519
	130	-	-	-	2178	1968	1612	1549	1509
	140	-	-	-	2166	1962	1603	1538	1501
	150	-	-	-	2139	1947	1589	1521	1485
Xray-1AKI pdb TMLJ									
	100	1986	1957	1927	1902	1874	1856	1835	1817
	110	1977	1948	1916	1889	1865	1846	1827	1812
	120	1966	1937	1909	1881	1856	1840	1821	1806
	130	1953	1926	1901	1873	1849	1830	1813	1797
	140	1946	1920	1894	1864	1842	1823	1808	1790
	150	1935	1908	1886	1856	1837	1818	1801	1784
100derecede		28.645384	25.50156	20.827522	15.87609	7.745576	13.94813	16.96719	18.4551
teorik farkı önce suya göre									
yükün bulunmadığı yerlerde									
10mM AAc ye göre 100derece									

Lizozim proteini için IMOS programı TMLJ yöntemi ile hesaplanan 1AKI X-ışını PDB (moleküler simülasyonu yapılmamış) dosyasına göre kıyaslanan verilerde CCS değerleri yüksek yüklerde simülasyon yapılmadığı halde çok farklı sonuçlar vermemiştir. Bunun nedeninin lizozimin yapısında bulunan dört adet disülfid bağının protein yapısını kulombik itişmelere karşı daha kararlı tutması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca düşük

yüklü iyonlar daha doğal konformasyonlara sahip olduğundan X-ışını PDB dosyasına benzer (%18.46 fark) CCS değerlerine sahip oldukları gözlenmiştir (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.6. Lizozim için iyon kaynağı sıcaklığının yükler üzerine etkisi (100 °C ve 150 °C ta kıyaslaması)

Lizozim								
Yük	12	11	10	9	8	7	6	5
Su 100-150 sıcaklık arası %CCS	2.8319939	2.928786	2.8181042	2.497162	1.592832			
10mM sıcaklık		1.714286	1.6027724	1.109057	0.663096	1.309635	1.234969	1.40047
25mM sıcaklık			3.0541012	2.186555	1.281723	2.134338	2.226588	2.21551
50mM sıcaklık				3.038674	1.832061	2.608696	2.851588	2.59222
Teorik sıcaklık	2.6013772	2.535576	2.1505376	2.448111	1.994072	2.06859	1.870187	1.83282

Lizozim için 100 °C ve 150 °C aralığındaki iyon sıcaklığı farkına bağlı olarak değişen CCS değerleri arasındaki fark, sitokrom c proteini için elde edilen verilere kıyasla daha düşüktür. Bunun ana etkeninin disülfid bağlarının yapıya bütünlük sağlaması olduğu söylenebilir. Ayrıca sitokrom c den farklı olarak su içerisinde lizozimin sıcaklıktan daha az etkilendiği söylenebilir (Çizelge 4.6.).