

**TUZAKLAMALI İYON HAREKETLİLİĞİ KÜTLE  
SPEKTROMETRİSİ İLE İNSAN İNSÜLİNİ VE  
ANALOGLARININ ANALİZİ**

**ANALYSIS OF HUMAN INSULIN AND ITS ANALOGUES  
BY TRAPPED ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY**

**NİMET BÜYÜKKÖY**

**PROF. DR. BEKİR SALİH**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

NİMET BÜYÜKKÖY'ün hazırladığı "Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi ile İnsan İnsülini ve Analoglarının Analizi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Belma IŞIK

Başkan

*Belma Işık*

Prof. Dr. Bekir SALİH

Danışman

*B. Salih*

Prof. Dr. Pınar AKKAŞ KAVAKLI

Üye

*Pınar Akkaş Kavaklı*

Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK

Üye

*Ömür Çelikbiçak*

Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet KAYILI

Üye

*H. Kayılı*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak ..... / ..... /..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Hayatımın anlamları Uğur'um ve Defne'me*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

\_\_\_ / \_\_\_ / 2019

NİMET BÜYÜKKÖY



## YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .... ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

..... / ..... / .....

(İmza)

  
NİMET BÜYÜKKÖY

# ÖZET

## TUZAKLAMALI İYON HAREKETLİLİĞİ KÜTLE SPEKTOMETRİSİ İLE İNSAN İNSÜLİNİ VE ANALOGLARININ ANALİZİ

**Nimet BÜYÜKKÖY**

**Yüksek Lisans, Kimya Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH**

**Haziran 2019, 73 sayfa**

İnsülin, insan hayatı için oldukça önemli, çevresel faktörlere karşı oldukça hassas bir hormondur. Kandaki şeker oranını düzenleyen insülin hormonu, aynı zamanda protein ve yağ metabolizmasında da görev almaktadır. Sahip olduğu fonksiyon özelliklerine göre kolaylıkla yapısal değişikliklere uğrayabilir. İnsülin hormonunun yapısında meydana gelen en ufak bir değişiklik, bu hormonun fizyolojik ve farmakolojik aktiviteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Birçok oligomerik yapısı bulunan insülinin monomer formu, biyolojik olarak aktif olduğu formudur. Farklı koşullar altında insülin yapısının ve fonksiyonlarının analiz edilebilmesi, daha iyi ve gelişmiş tedavi yöntemleri sunmak için oldukça önemlidir.

Biyomoleküller ile yapılan çalışmalarda yapısal bilgiye duyulan ihtiyaç artmaktadır. Çünkü tek bir protein, katlanma şekline bağlı olarak birçok farklı işlev ve özelliğe sahip olabilir. Bir iyonun üç boyutlu yapısı hakkında bilgi veren iyon hareketliliği spektrometrisi (Ion Mobility Spectrometry, IMS), molekülü nitelendirmede çok güçlü bir analitik teknik olan kütle spektrometrisi (Mass Spectrometry, MS) ile

birleştirildiğinde, molekülün konformasyon özellikleri hakkında en doğru ve güvenilir bilgiyi veren cihaz durumuna gelmektedir. IMS, iyonları gaz fazında büyüklük (Etkin Çarpışma Kesiti, CCS) ve şekillerine göre ayırırken, MS, kütle/yük oranına göre ayırmaktadır. IMS ile birleştirilen MS sistemi (IM MS) ile incelenen molekülün sadece kütesini belirlemekle kalmayıp, molekülün büyüklüğü, şekli hakkında da bilgi sahibi olunmaktadır. İyonları ayırma şekline göre isimlendirilen Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry, TIMS MS) tekniği, farklı türlerdeki örneklerin hızlı analizi, yüksek hassasiyet, daha iyi ayırım gücü avantajlarını sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisi tekniği ile insan insülini ve analoglarının çeşitli çözücü, voltaj ve sıcaklıklarda konformasyon özellikleri incelenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile, insülin molekülünün konformasyonel özelliklerinin belirlenmesi, yapı-fonksiyon ilişkilerinin analiz edilmesi, analoglarının birbirinden ayırt edilerek yüksek hassasiyet ve doğrulukla tanımlanabilmeleri sağlanmıştır. Çözücünün insülin hormonunun konformasyonu üzerindeki etkisi, cihaz parametreleri olan iyon kaynağı sıcaklığı ve kapiler voltajının etkisinden oldukça fazladır. İnsülin hormonunun konformasyonu hakkında detaylı bilgi sahip olduğumuz bu çalışma, bu hormon ile yapılacak olan bütün çalışmalara öncülük edecektir.

**Anahtar Kelimeler:** İnsülin, Tuzaklamalı İyon Hareketliliği spektrometrisi, Kütle Spektrometrisi, Etkin Çarpışma Kesiti, Oligomerik Dağılım.

## **ABSTRACT**

### **ANALYSIS OF HUMAN INSULIN AND ITS ANALOGUES BY TRAPPED ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY**

**Nimet BÜYÜKKÖY**

**Master of Science, Department of Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH**

**June 2019, 73 pages**

Insulin is very important for human life and highly sensitive to environmental factors. The insulin hormone that regulates the sugar in the blood is also involved in protein and fat metabolism. It can easily undergo structural changes according to its functions. The slightest change in the structure of insulin hormone has an important effect on the physiological and pharmacological activities of this hormone. The monomer form of insulin with many oligomeric structures is the form in which it is biologically active. Analyzing insulin structure and functions under different conditions is important to provide better and improved treatment methods.

The need for structural knowledge in studies with biomolecules is increasing. Because a single protein, depending on the form of folding can have many different functions and features. Ion Mobility Spectrometry (IMS), which gives information about the three-dimensional structure of an ion, becomes a device that gives the most accurate and



reliable information about the conformation properties of the molecule when combined with mass spectrometry (MS), which is a very powerful analytical technique for characterizing the molecule. The IMS separates ions according to the size of the gas phase (Collision Cross-Section, CCS) and their shape, while the MS separates them according to the mass / charge ratio. With the MS system combined with the IMS (IM MS), it is not only the mass examined but also the size and shape of the molecule. Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry (TIMS MS) technique, which is named according to the way of separating the ions, offers the advantages of rapid analysis of different types of samples, high sensitivity, better resolving power.

In this thesis, the conformational properties of human insulin and its analogs in various solvents, different voltages and temperatures were investigated by the technique of trapped ion mobility mass spectrometry. The results obtained in the thesis study, identify the conformational properties of the insulin molecule, analyze the structure-function relationships, distinguish the analogues from each other and ensure that they can be defined with high precision and accuracy. The effect of the solvent on the conformation of insulin hormone is considerably greater than the effect of the instrument parameters, ion source temperature and capillary voltage. This study, which we have detailed information about the conformation of insulin hormone, will lead all studies to be done with this hormone.

**Keywords:** Insulin, Trapped Ion Mobility Spectrometry, Mass Spectrometry, Collision Cross Section, Oligomeric Distribution.

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitime başladığımdan itibaren her durumda beni destekleyen, ara vermek zorunda kaldığımda ve hatta geri dönmek istediğimde de hep yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim, sonsuz sevgi ve saygılarımla değerli hocam Prof. Dr. Bekir Salih'e verdiği emekler için ne kadar teşekkür etsem yeterli olacağını düşünmüyorum.

Her aradığımda, başımın her sıkıştığında ulaşabildiğim, desteğini her zaman hissettiren, yardımları olmadan asla başaramayacağımı düşündüğüm değerli hocam Dr. Mehmet Atakay'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan mutlu olduğum, her konuda destek olan bütün SAREG üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzak, yakın farketmeden, sıkıldığımda, mutlu olduğumda ve diğer bütün duyguları paylaştığım, isimlerini yazmadan kendilerinden bahsettiğimi bilen bütün arkadaşlarıma, yanımda oldukları için, paylaştıklarımız için teşekkür ediyorum ve iyi ki varsınız diyorum.

Hayatımda her zaman desteklerini hissettiğim, bana hep inanan canım aileme teşekkür ediyorum. Varlığınız en büyük güç kaynağım.

Hayatıma girdiğinden itibaren her saniye ne kadar şanslı olduğumu hissettiren, bana olan sevgisi ve inancına kendimden daha çok inandığım, sırdaşım, yoldaşım, hayat arkadaşım, değerli eşim Uğur'a sonsuz teşekkür ediyorum. Uğurum ve dünyalar güzeli kızım Defne, hayatımda olduğunuz, birlikte geçirdiğimiz her saniye ve bundan sonra geçireceğimiz bir ömür için şükrediyorum.

Nimet BÜYÜKKÖY

Haziran 2019, Ankara

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnsülin.....	3
2.2. Kütle Kütle Spektrometrisi.....	7
2.2.1. İyon Kaynağı.....	7
2.2.2. Kütle Ayırıcıları.....	9
2.2.3. Dedektörler.....	11
2.3. İyon Hareketliliği – Kütle Spektrometrisi (IM – MS).....	12
2.3.1. Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Spektrometrisi (TIMS).....	16
2.3.2. Etkin Çarpışma Kesiti (Collision Cross Section, CCS).....	19
2.3.3. TIMS ile Protein Analizleri.....	22
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	28
3.2. İyon Hareketliliği - Kütle Spektrometrisi (IM – MS) Analizleri.....	28
4. TARTIŞMA VE YORUM.....	30
4.1. İnsan İnsülininin TIMS-TOF-MS ile Analizi.....	30
4.1.1. İnsan İnsülininin Konformasyonu Üzerinde Çözücü Etkisi.....	30
4.1.2. İnsan İnsülininin Konformasyonu Üzerinde Sıcaklık Değişimi Etkisi.....	36
4.1.3. İnsan İnsülininin Konformasyonu Üzerinde Kapiler Voltajı Değişimi Etkisi.....	41

4.2. İnsülin Analoglarının TIMS-TOF-MS ile Analizi.....	44
5. SONUÇLAR.....	50
6. KAYNAKLAR .....	57
EKLER.....	69
EK 1 – İnsan insülininin amonyum asetat ile hazırlanmış çözeltisinin iyon kaynağı sıcaklığı ve kapiler voltajı değişimine göre belirli iyonlarının etkin çarpışma kesiti (CCS) ve hareketlilik ( $1/K_0$ ) değerleri.....	69
EK 2 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	73
ÖZGEÇMİŞ .....	74

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	İnsan (human), domuz (porcine) ve sığır (bovine) insülininin amino asit dizilimi [11]. ....	4
Şekil 2.2.	Preproinsülin, proinsülin ve insülinin yapısı [13]. ....	4
Şekil 2.3.	İnsülin oligomerik yapısının oluşumu [14]. ....	5
Şekil 2.4.	Monomer insülinin dimer ve heksamer formunu oluşturması, T ve R konformerlerinin gösterimi [20]. ....	6
Şekil 2.5.	Kütle spektrometresinin temel bileşenleri [31]. ....	7
Şekil 2.6.	ESI sisteminin şematik gösterimi [31]. ....	9
Şekil 2.7.	Dört kutuplu kütle ayırıcısının şematik gösterimi [35]. ....	10
Şekil 2.8.	İnsan insülininin kütle spektrumu. ....	12
Şekil 2.9.	IM- MS cihazının temel bileşenleri [41] ....	14
Şekil 2.10.	IMS çeşitlerinin şematik gösterimi (A,B) Zamana göre ayırma yöntemi,(C,D) Konuma göre ayırma yöntemi, (E) İyon hapsetme/seçimli bırakma yöntemi [61]. ....	15
Şekil 2.11.	TIMS cihazının şematik gösterimi [74]. ....	16
Şekil 2.12.	Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisinin (TIMS) çalışma prensibinin şematik gösterimi [77]. ....	17
Şekil 2.13.	İnsan insülininin iki boyutlu ısı haritası. ....	18
Şekil 2.14.	Şekil 2.13'te seçilen bölgenin kütle spektrumu. ....	18
Şekil 2.15.	İnsan insülininin, kütle/yük oranı aynı olan iki farklı iyonunun ısı haritasında gösterimi. ....	21
Şekil 2.16.	Şekil 2.15'te gösterilen iki farklı iyonun mobilogramlarının gösterimi. ....	21
Şekil 2.17.	İnsan insülininin Amonyum asetat (AAC) + Asetonitril (ACN) + Formik Asit (FA) (v/v: 50:50:0.1) çözeltisinde, 1200 V kapiler voltajı ve 120 °C iyon kaynağı sıcaklığındaki IM - MS analizlerinden elde edilen iki boyutlu ısı haritası. ....	23
Şekil 2.18.	İnsan insülininin AAC+ACN+FA çözeltisinde 1200V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında, +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) iyonlarının (m/z: 1936,7220) mobilogramı. ....	24

Şekil 2.19.	İnsan insülini ( $m/z:1936,7220$ ) iyonunun kütle spektrumunun gösterilmesi. ....	25
Şekil 2.21.	İnsan insülininin iki boyutlu ısı haritasında seçilmiş +4 yüklü monomer iyonunun ( $m/z:1452,6677$ ) mobilogramının, etkin çarpışma kesitinin (CCS) ve kütle spektrumunun gösterimi. ....	26
Şekil 4.1.	Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü monomer (M+5, $m/z:1162,3318$ ) iyonuna ait mobilogramlar. ....	31
Şekil 4.2.	Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7, $m/z: 1660,1866$ ) iyonuna ait mobilogramlar. ....	32
Şekil 4.3.	AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer iyonunun (D+7, $m/z: 1660,1866$ ) kütle spektrumu. ....	32
Şekil 4.4.	Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +6 yüklü dimer (D+6) ve +3 yüklü monomer (M+3) ( $m/z: 1936,8836$ ) iyonlarına ait mobilogramlar. ....	34
Şekil 4.5.	Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +10 yüklü tetramer (Q+10) ve +5 yüklü dimer (D+5) ( $m/z: 2323,8595$ ) iyonlarına ait mobilogramlar. ....	35
Şekil 4.6.	Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +12 yüklü heksamer (H+12), +6 yüklü trimer (T+6) ve +4 yüklü dimer (D+4) ( $m/z: 2904,4056$ ) iyonlarına ait mobilogramlar. ....	36
Şekil 4.7.	AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7) ( $m/z: 1660,1857$ ) iyonuna ait mobilogramlar. ....	37
Şekil 4.9.	AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü dimer (D+5) ve +10 yüklü tetramer (Q+10) ( $m/z: 2323,8578$ ) iyonlarına ait mobilogramlar. ....	39

- Şekil 4.10. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü hegzamer (H+12) (m/z: 2904,4572) iyonlarına ait mobilogramlar. ....40
- Şekil 4.12. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) (m/z: 1936,5483) iyonlarına ait mobilogramlar. ....42
- Şekil 4.13. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +10 yüklü tetramer (Q+10) ve +5 yüklü dimer (D+5) (m/z: 2323,8595) iyonlarına ait mobilogramlar. ....43
- Şekil 4.14. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü hegzamer (H+12) (m/z: 2904,5784) iyonlarına ait mobilogramlar. ....44
- Şekil 4.15. AAC+ACN+FA (1:1 (10 mM AAC:ACN) % 0.1 FA (v/v)) çözücüsünde hazırlanan HIns, PIns ve BIns örneklerinin 2200 V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7) iyonlarına ait mobilogramlar. ....46
- Şekil 4.16. AAC+ACN+FA (1:1 (10 mM AAC:ACN) % 0.1 FA (v/v)) çözücüsünde hazırlanan HIns, PIns ve BIns örneklerinin 2200 V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) iyonlarına ait mobilogramlar. ....47
- Şekil 4.17. AAC+ACN+FA (1:1 (10 mM AAC:ACN) % 0.1 FA (v/v)) çözücüsünde hazırlanan HIns, PIns ve BIns örneklerinin 2200 V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü dimer (D+5) ve +10 yüklü tetramer (Q+10) iyonlarına ait mobilogramlar. ....48
- Şekil 4.18. AAC+ACN+FA (1:1 (10 mM AAC:ACN) % 0.1 FA (v/v)) çözücüsünde hazırlanan HIns, PIns ve BIns örneklerinin 2200 V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden

elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü  
hekzamer (H+12) iyonlarına ait mobilogramlar. .... 49





## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

A	Angstrom
e	Elektron yükü
E	Elektriksel alanın şiddeti
K	İyon hareketlilik sabiti
K0	İndirgenmiş iyon hareketlilik sabiti
kb	Boltzmann sabiti
N	Sürükleyici gaz yoğunluğu, hacim başına düşen molekül sayısı
P	Basınç
P0	Standart basınç
T	Sıcaklık
T0	Standart sıcaklık
Vd	Sürüklenme hızı
z	İyonun yükü
$\Omega$	Etkin çarpışma kesiti
$\mu$	İndirgenmiş kütle

### Kısaltmalar

AAC	Amonyum Asetat
ACN	Asetonitril
BIns	Sığır İnsülini
CI	Kimyasal İyonlaştırma
CCS	Etkin Çarpışma Kesiti

Da	Dalton
DC	Doğru akım
D	Dimer
DMA	Tekdüze alan hareketlilik analizörleri
DTIMS	Sürüklenme tüpü iyon hareketliliği spektrometrisi
E. coli	Escherichia coli
EI	Elektron İyonlaştırma
ESI	Elektrosprey İyonlaşma
FA	Formik Asit
FAB	Hızlı atom bombardımanı
FAIMS	Alan asimetric iyon hareketliliği spektrometrisi
H	Hekzamer
IMS	İyon Hareketliliği Spektrometrisi
IMS-MS	İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi
IT	İyon tuzaklı
M	Molekül kütlesi
M+5	+5 yüklü monomer
MeOH	Metanol
MS	Kütle Spektrometrisi
MW	Ağrılıkça ortalama molekül kütlesi
m	Sürükleyici gazın molekül kütlesi
Q/ToF	Dört kutuplu uçuş zamanlı
Q	Tetramer
PIns	Domuz insülini
rHIns	Rekombinant insan insülini
RF	Radyo frekansı

TOF	Uçuş zamanlı
T	Trimer
TIMS	Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisi
TWIM	Kaydırmalı dalga iyon hareketliliği
TMMIS	Frekans taramalı iyon hareketliliği seçimi yapan çapraz ayarlı iyon hareketlilik spektrometresi



# 1. GİRİŞ

İnsülin, insan hayatı için oldukça önemli ve çevresel faktörlere karşı oldukça hassas bir hormondur. Sahip olduğu fonksiyon özelliklerine göre kolaylıkla yapısal değişikliklere uğrayabilir. İnsülinin yapısında meydana gelen en ufak bir değişiklik bile bu hormonun fizyolojik ve farmakolojik aktiviteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Farklı koşullar altında, insülin yapısının ve fonksiyonlarının analiz edilebilmesi daha iyi ve gelişmiş tedavi yöntemleri sunmak için oldukça önemlidir.

Günümüzde biyomoleküller üzerine yapılmakta olan çalışmalarda yapısal bilgiye duyulan ihtiyaç artmaktadır. Örneğin, tek bir proteinin katlanma şekline bağlı olarak birçok farklı işlev ve özelliğe sahip olabilir. Kütle spektrometrisi (Mass Spectrometry, MS), gaz fazındaki iyonları kütle/yük oranına ( $m/z$ ) göre ayıran etkili bir analitik tekniktir. Birçok araştırma alanında kullanılmakta olan kütle spektrometrisi, yüksek hassasiyet, doğruluk ve molekül hakkında yararlı bilgiler sunmaktadır. Bu bilgiler sayesinde moleküllerin kimyasal yapılarının ve fonksiyonlarının aydınlatılması sağlanmaktadır. MS, çok güçlü bir analitik cihaz olmasına rağmen, aynı  $m/z$  oranına sahip farklı türleri ayırt edememektedir. Bir iyonun üç boyutlu yapısı hakkında bilgi veren iyon hareketliliği spektrometrisi (IMS) ile birleştirilmiş kütle spektrometrisi (IM-MS), bu sorunu büyüklük, şekil ve yüke göre ayırma ekleyerek çözmektedir. İyon hareketliliği spektrometresi gaz fazındaki iyonları, etkin çarpışma kesitlerine (Collision cross section, CCS) göre ayırırken, kütle spektrometresi ile birleştirildiğinde ayırma  $m/z$  oranına göre de yapılmaktadır. IM-MS, sadece molekülün kütlesini belirlemekle kalmayıp, aynı zamanda molekülün şekli hakkında da bilgi vermektedir. Bu analitik yöntem, farklı türlerdeki örneklerin hızlı analiz edilebilmesi, yüksek hassasiyeti, daha iyi ayırım gücü avantajlarını sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisi ile insülin ve insülin analoglarının çeşitli çözücü bileşimlerinde, voltaj ve sıcaklık değerlerinde konformasyon özellikleri incelenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda, insülin molekülünün konformasyonel özelliklerinin belirlenmesi, yapı – fonksiyon ilişkilerinin analiz edilmesi, analoglarının birbirinden ayırt edilerek yüksek

hassasiyet ve doğrulukla tanımlanabilmeleri için özgün metot geliştirilmesine katkıda bulunulmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnsülin

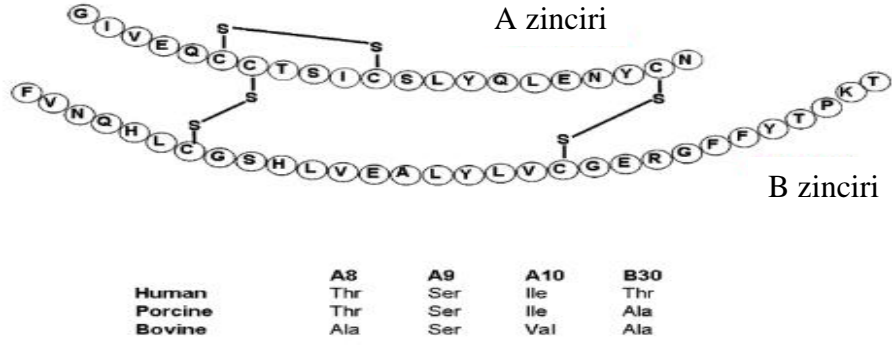
İnsülin, pankreas beta hücrelerinden salgılanan, kandaki şeker oranını düzenleyen, protein ve yağ metabolizmasında görev alan bir hormondur. Vücudumuzda şekerin depolandığı glikojenin üretimini artırır. Hücreye amino asit ve şekerin geçişini kontrol eder. Yağ yakımını artırır, kas dokusunu güçlendirir ve protein sentezini hızlandırır [1-3]. Şeker hastalığı, diğer adı ile diyabet, insülinin yetersiz salgılanması ya da hiç salgılanmaması durumunda, kişinin kanında yüksek miktarda şeker bulunmasına neden olan çok önemli bir sağlık problemidir. Kanda yüksek miktarda şeker bulunması kalp, böbrek rahatsızlıkları, felç gibi insana hayati tehlike yaşatan durumlara sebebiyet vermektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2011 yılında yaptığı araştırmaya göre dünyada yaklaşık 366 milyon insanın şeker hastası olduğu ve bu rakamın 2030 yılında 522 milyonun üzerinde olması beklendiği belirtilmiştir [4].

1922 yılında şeker düşüklüğünden ölmek üzere olan bir çocuğa laboratuvarında pankreas hücrelerinden izole ettiği insülini enjekte ederek hayatını kurtaran Frederick Banting, bu sayede 1923 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülünü almıştır. Ancak insülin hormonunun yapısı 1955 yılında Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İnsülin hormonunun yapısının tanımlanmasını sağlayan çalışma ile F. Sanger de Nobel ödülü almıştır [5-7].

Her memeli hayvanın kendine özgü insülin yapısı vardır. Bununla birlikte insülin, hayvanlar arasında birçok yönden benzer bir protein zinciridir. Domuz (PIns) ve sığır (BIns) insülini, yapısı ve işlevi ile insan insüline (HIns) en yakın insülin türüdür. Sığır insülini, insan insülininden üç, domuz insülini ise sadece bir farklı amino asit içermektedir (Şekil 2.1). 5808 Da moleküler kütleye sahip insan insülini, iki uzun amino asit zincirine sahiptir. Zincirler, 21 amino asitli A zinciri ve 30 amino asitli B zinciridir (Şekil 2.1). Kimyasal yapısında A ve B zincirini birbirine beğlayan iki adet zincirler arası disülfid köprüsü, A zinciri üzerinde de bir adet zincir içi disülfid köprüsü bulunmaktadır [8]. A7 – B7 ve A20 – B19 amino asitleri arasındaki disülfid köprüleri kolaylıkla indirgenebilir. Ama A6 – A11 amino asitleri üzerindeki zincir içi disülfid bağı daha kararlıdır ve biyolojik fonksiyonu çok önemlidir [9,10]. Tüm memeli insülin formlarında bu bağlantılar benzer durumdadır.

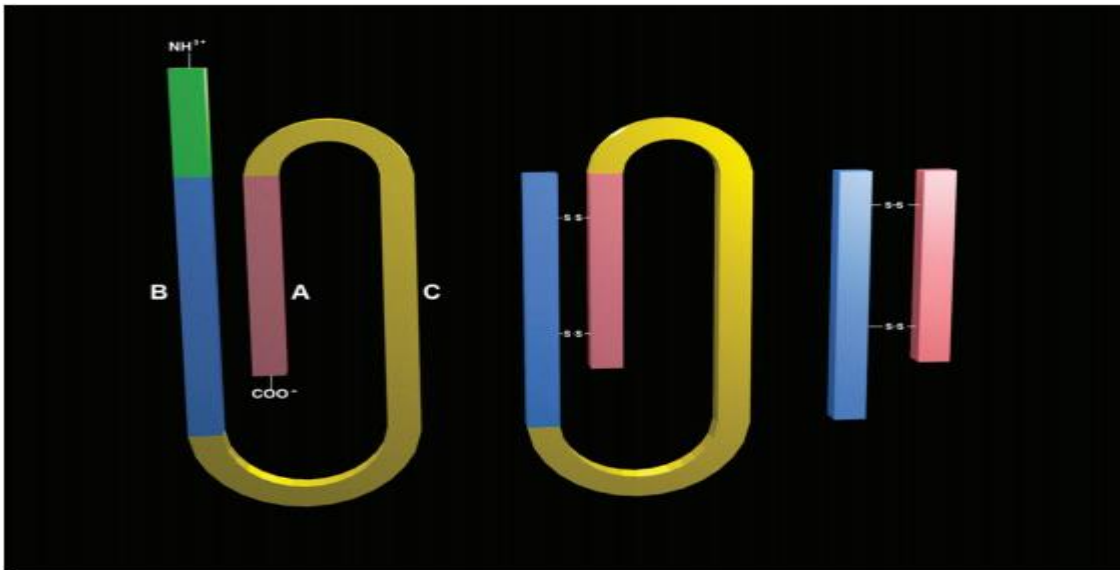


## İnsülin



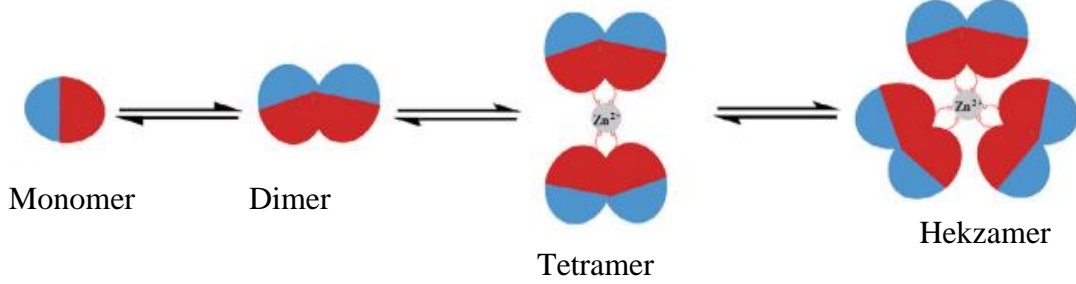
Şekil 2.1. İnsan (human), domuz (porcine) ve sığır (bovine) insülininin amino asit dizilimi [11].

İnsülin proteini başlangıçta pankreasın beta hücrelerinde 110 amino asitten oluşan tek bir molekül olan preproinsülin olarak üretilir [12]. Preproinsülinin bir ucundan 24 amino asit, enzim etkisiyle uzaklaştırılır ve geriye başka form olan 86 amino asit zinciriyle proinsülin kalır. Proinsülin, moleküle son halini vermek için katlanır, bağlanır ve üç disülfid bağı burada oluşur. Proinsülin enzim yardımı ile insülin ve C-peptit adlı moleküle parçalanır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Preproinsülin, proinsülin ve insülinin yapısı [13].

İnsülin hormonu, monomer, dimer, trimer, tetramer ve hegzamer gibi birçok kompleks oligomerik yapı oluşturmaya eğilimlidir. Bu yapılar insülinin biyolojik aktivitesini kontrol ederek fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesini sağlamaktadır [14].



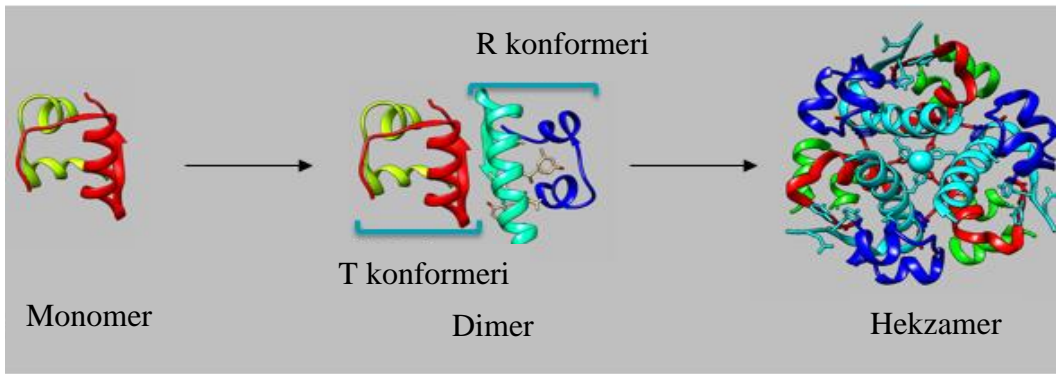
Şekil 2.3.İnsülin oligomerik yapısının oluşumu [14].

İnsülin molekülleri, B zincirinin C- uçları arasında oluşan hidrojen bağından dolayı dimer oluşturma eğilimi göstermektedir. Buna ek olarak, çinko iyonlarının varlığında, insülin dimerleri hegzamer oluşturmak için birleşir. İnsülinin hegzamerik yapısı en kararlı yapısı olmasına rağmen, monomerik yapısı kan şekerinin düzenlenmesinde daha etkilidir [15]. Bu etkileşimlerin önemli sonuçları vardır. Monomerler ve dimerler kolayca kan içine dağılırken, hegzamerler zayıf şekilde dağılır. Bu nedenle, yüksek oranda hegzamer içeren insülin preparatlarının emilimi geciktirilir ve biraz yavaşlar. Bu durum insanları daha etkili insülin analogu geliştirmeye teşvik etmiştir. İnsüline benzeyen, aynı işlemi gören bu moleküllere insülin analogu denmektedir. Önceden şeker hastaları, domuz ve sığır gibi hayvanlardan elde edilen insülin ile tedavi edilirken, alerji riskini en az düzeye indirmek ve daha farklı yöntemler ile insülin elde etmek amacıyla çalışmalar sürdürülmüştür. Günümüzde insüline duyulan ihtiyacın artması, hayvansal kaynaklardan elde edilen insülinin yeterli olmayışı, alerji riskinden dolayı insülinin laboratuvar ortamında rekombinant DNA teknolojisi ile Escherichia Coli (E. Coli) ya da maya gibi bakteriler kullanılarak elde edilmesini tercih edilir duruma getirmiştir. Bu teknoloji ile elde edilen insüline rekombinant insan insülini (recombinant human insulin, rHIIns) denilmektedir. Üretilen bu insülin, kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak, insanın pankreas beta hücrelerinde salgılanan insüline eşdeğerdir. Rekombinant insan insülini yanında, rekombinant teknoloji ile üretilen birkaç insülin benzeri molekül mevcuttur. Üretilen bu insülinlerin fizyolojik etkilerini artırmak için amino asit zincirinde değişiklikler yapılmaktadır [15]. Bakterilerden üretilen insülinler sentetik analog, sığır ya da domuzdan elde edilen insülin çeşitleri de hayvansal analoglardır.

Rekombinant insan insülini, insan pankreas beta hücrelerinden salgılanan insülin ile tamamen aynı moleküler ağırlığa sahiptir (5808 Da).

İnsan insülini, çözeltilerde genellikle monomerik ya da dimerik yapıları arasında dengede bulunmaktadır. Fizyolojik koşullarda ise birden fazla oligomerik insülin yapısı aynı anda mevcut olabilir. Bu durum biyofiziksel karakterizasyon için zorluklar çıkarabilir. İnsan insülin oligomerlerinin yapıları, tek bir oligomerik yapının mevcut olduğu koşulların sağlandığı ve; o oligomerik yapı hakkında bilgi almak amacıyla yapılan çalışmalarla analiz edilmektedir [16 - 18].

İnsülin proteinin üç boyutlu yapısı, rahat (Relaxed, R) ve gergin (Tense, T) konformasyon özelliklerine sahip olabilmektedir (Şekil 2.4) [19].

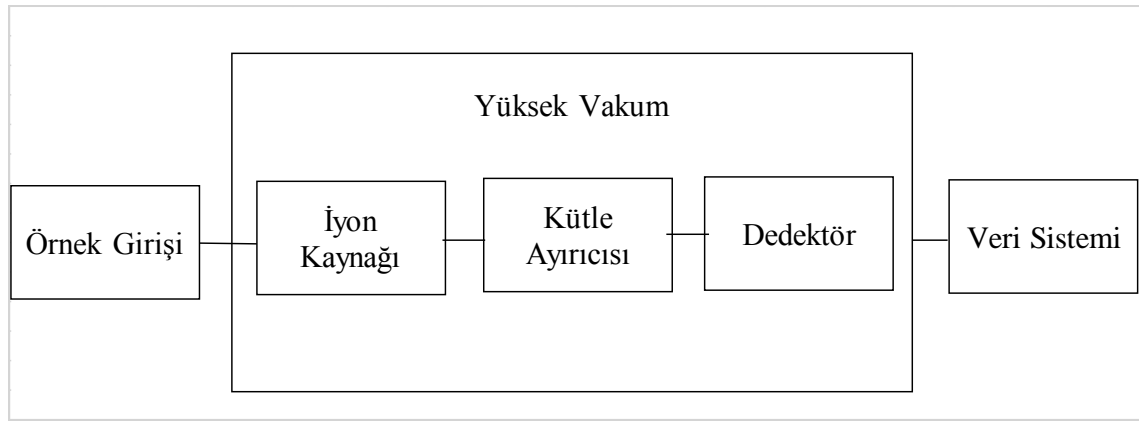


Şekil 2.4. Monomer insülinin dimer ve hegzamer formunu oluşturması, T ve R konformerlerinin gösterimi [20].

İnsülinde bulunan B zinciri, T ve R konformasyonunda bulunur, Pdb Id: 4GBC [20]. T konformasyonunda kalıntılar daha genişletilmiş görünürken, R konformasyonunda kalıntılar sarmalın içinde bulunur [21]. R konformasyonu, ortamda klor iyonu varlığında ve yüksek derişimde fenol varlığında hegzamerlerde daha çok görünürken, T konformasyonu, monomerlerde, dimerlerde, ve klor ve fenol olsun ya da olmasın hegzamerlerde de bulunmaktadır [22 - 26].

## 2.2. Kütle Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisi (Mass Spectrometry, MS), gaz fazındaki iyonları, kütle/yük (mass/charge,  $m/z$ ) oranlarının ölçümüne dayanarak ayırabilen ve tanımlayabilen güçlü bir analitik tekniktir. Yüksek hassasiyet, seçicilik, analiz hızı, düşük miktarda örnekle çalışabilme, karışımlarda bulunan tüm türler için ayrı sinyal elde edilebilmesi ve polimerlerden, biyolojik örneklere kadar birçok molekülün analizinin yapılabilmesi gibi özellikleri sayesinde kütle spektrometri teknikleri, diğer analitik tekniklere göre daha çok tercih edilmektedir [27 - 30]. Bir kütle spektrometresinin temel bileşenleri, örnek giriş sistemi, iyon kaynağı, kütle ayırıcısı, dedektör ve veri analiz sisteminden oluşmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri [31].

Örnek giriş sistemi, analiz edilecek örneği, iyon kaynağına uygun bir şekilde iletmektedir. İyon kaynağı, çalışılacak örnekten iyonlar oluşturur. Kütle analizörü, iyon kaynağından üretilen iyonları kütle/yük oranına göre birbirinden ayırır. Kütle/yük oranına göre ayrılan bu iyonlar dedektöre gönderilir. Dedektör sinyal oluşturur ve sinyaller bilgisayar sistemi ile kütle spektrumu verilerine dönüştürülür. Analiz edilen örnekler ile diğer gaz moleküllerinin etkileşime girmelerini engellemek için sistem yüksek vakum altında çalışmaktadır [31].

### 2.2.1. İyon Kaynağı

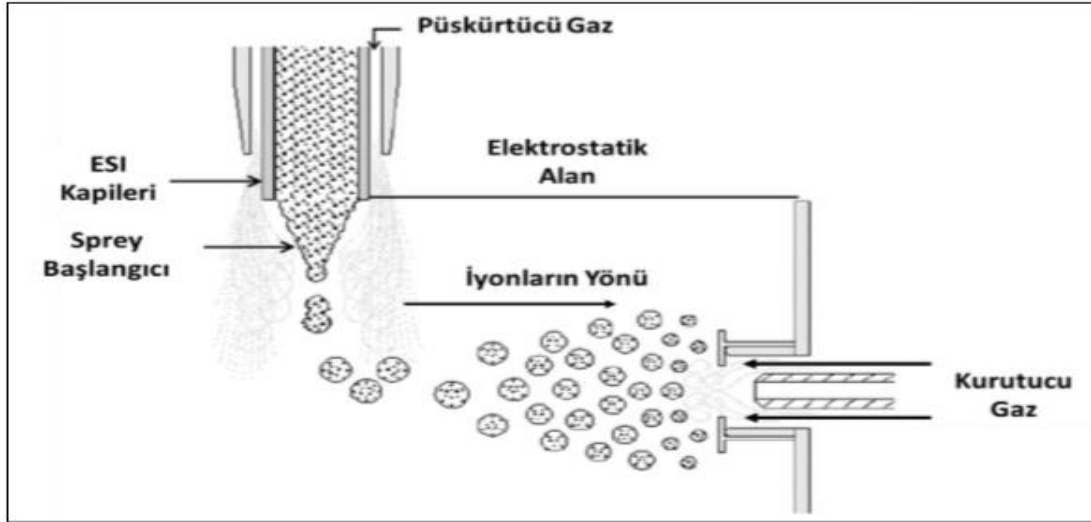
İyonların oluşturulması, kütle spektrometrik tekniklerin ilk ve en önemli basamaklarından biridir. Örnek hazırlama ve analiz için çeşitli iyonlaştırma yöntemleri

mevcuttur. Bu yöntemler, genel olarak “sert” ve “yumuşak” olarak iki temel şekilde sınıflandırılmaktadır. Sert iyonlaştırma yöntemleri, uygulanan yüksek enerjiden dolayı, analiz edilen iyonları parçalamaktadır. Bu tür parçalanmalar yapılan analizi zorlaştırmaya ve elde edilen verilerin, iyonun yapısını değerlendirmek için yetersiz olmasına neden olmaktadır. Sert iyonlaştırma tekniklerine, elektron iyonlaştırma (EI), kimyasal iyonlaştırma (CI), hızlı atom bombardımanı (FAB), alan iyonlaştırma (FI) ve alan desorpsiyonu (FD) yöntemleri örnek verilebilir [32]. Yumuşak iyonlaştırma tekniklerinden en çok tercih edileni elektrosprey iyonlaştırma yöntemidir.

### **2.2.1.1. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)**

Biyomoleküller oldukça hassas moleküllerdir. Çözelti halinde yüklü iyon haline gelirken parçalanabilmektedir. Bu durum, analizlerini zorlaştırmakta ve yetersiz sonuçların alınmasına neden olmaktadır. Bu yüzden, biyomoleküller ile çalışılırken daha yumuşak iyonlaştırma yöntemleri tercih edilmektedir. Çünkü, yumuşak iyonlaştırma teknikleri ile molekülün bütünlüğü bozulmadan iyon üretilebilmektedir. John Fenn ve arkadaşları biyomoleküllerin parçalanmadan, daha hassas bir şekilde iyonlaşacağı, elektrosprey iyonlaştırma tekniğini (ESI) geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu teknikle 2002 yılında kimya alanında Nobel ödülünü kazanmışlardır [33, 34].

ESI tekniğinde, çözücü içerisinde bulunan analit, atmosferik basınçta yüksek voltaj uygulanan kapilerden püskürtücü gaz eşliğinde yüklenmiş olarak spreylenir ve püskürtülür ve çözücüden kurtulana kadar kurutucu gaz gönderilir. Kurutucu gaz sayesinde çözücüden kurtulan yüklenmiş iyonlar kütle ayırıcısına gönderilir (Şekil 2.6) [31].



Şekil 2.6. ESI sisteminin şematik gösterimi [31].

### 2.2.2. Kütle Ayırıcıları

Kütle ayırıcısı, iyon kaynağından gönderilen yüklenmiş gaz fazındaki iyonları kütle/yük oranlarına göre ayırmaktadır. Bu sistem, ortamda bulunan başka gaz molekülleri ile etkileşime girmemesi için sürekli vakum altında bulundurulmaktadır. İyi bir kütle ayırıcının özelliklerini, kütle sınırı, iyon iletim verimi, ayırıcılık gücü, kütle doğruluğu, dinamik aralığı ve çalışma basıncı değeri gibi parametreler belirlemektedir. İyon kaynağından gönderilen yüklenmiş iyonları ayırma şekillerine göre, manyetik alanlı ayırıcı (Magnetic sector), dört kutuplu kütle ayırıcı (Quadrupole), iyon tuzaklı kütle ayırıcı (ion trap), uçuş zamanlı kütle ayırıcı (time of flight) yaygın olarak kullanılan kütle ayırıcılarıdır. Bütün analizler için uygun kütle ayırıcı bulunmamaktadır. Kütle ayırıcılarının kendine özgün kullanım alanları vardır. Kütle ayırıcısının seçiminde, kütle sınırı, iyon iletim verimi, ayırıcılık gücü, kütle doğruluğu, dinamik aralığı ve çalışma basıncı değeri özellikleri etkin rol oynamaktadır [31].

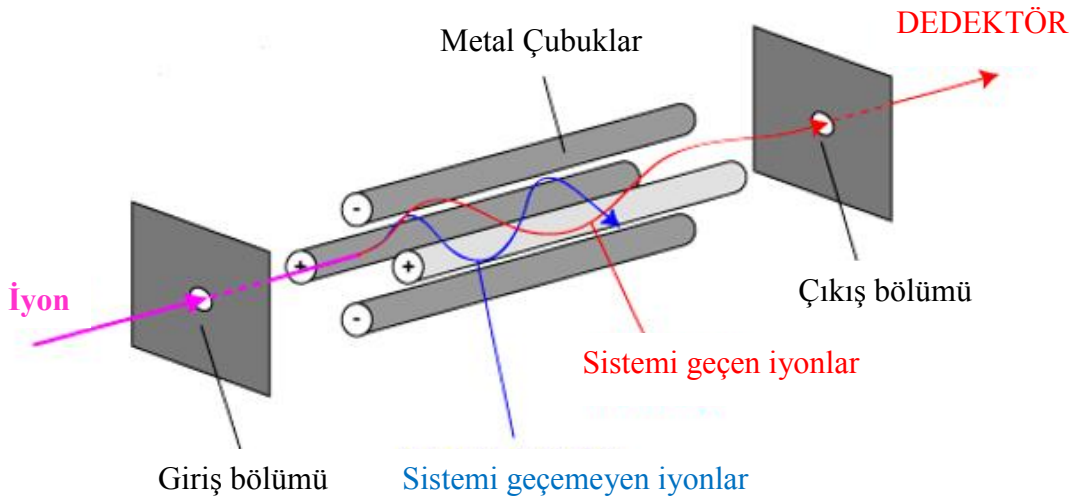
Kütle spektrometrisi ile en çok kullanılan ve tez kapsamında da kullanılmış olan kütle ayırıcıları, dört kutuplu kütle ayırıcısı ve uçuş zamanlı kütle ayırıcısıdır.

#### 2.2.2.1. Dört Kutuplu Kütle Ayırıcı

Dört kutuplu kütle ayırıcı, kullanım kolaylığı, hassasiyet ve hızlı analiz avantajları ile en çok tercih edilen kütle ayırıcılarından biridir. Birbirlerine paralel yerleştirilmiş dört adet

silindir metal çubuktan oluşmaktadır. Dört çubuk birbirine paralel olarak mükemmel şekilde yerleştirilmiş ve doğru akım (DC) ve radyo frekansı (RF) güç kaynakları ile bağlanmıştır. Karşıt çubuklar, salınımlı bir elektrik alanı oluşturmak için farklı kutuplara sahiptir. Oluşan iyonlar arasında ancak belirli kütle/yük oranına sahip olanlar, çubukların arasından geçerek dedektöre ulaşmaktadır.

Pozitif yüklenmiş iyon, negatif yüklenmiş çubuğa doğru çekilecektir. Çubuk polaritesini değiştirmeden önce iyon çubuğa ulaşırsa, çubuğa dokunur ve nötr hale gelir. Kütle spektrometrisi iyonları analiz ettiği için, nötr molekül analiz edilemez. Dört kutuplu kütle ayırıcının belirli bir kütle aralığını seçici olarak analiz etmesinin nedeni budur. Eğer pozitif yüklü iyonlar çubuğa ulaşmadan önce kutuplar değişirse, bulunduğu yere en yakın negatif çubuğa doğru hareket eder. Yüklenmiş iyon dört kutuplu kütle ayırıcısından çıkana kadar dönüşümlü olarak devam eder (Şekil 2.7) [35].



Şekil 2.7. Dört kutuplu kütle ayırıcısının şematik gösterimi [35].

### 2.2.2.1. Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı

Uçuş zamanlı kütle ayırıcısının en basit formu 1946 yılında W. E. Stephens tarafından, farklı  $m/z$  oranlarına sahip iyonların bilinen uzunlukta bir uçuş tüpü boyunca geçtiği bir cihaz olarak geliştirilmiştir [36]. Tüm iyonlar aynı anda uçuş tüpünü geçmeye başlarsa, dedektöre bir iyonun varış zamanı,  $m/z$  oranını belirlemek için kullanılabilir.

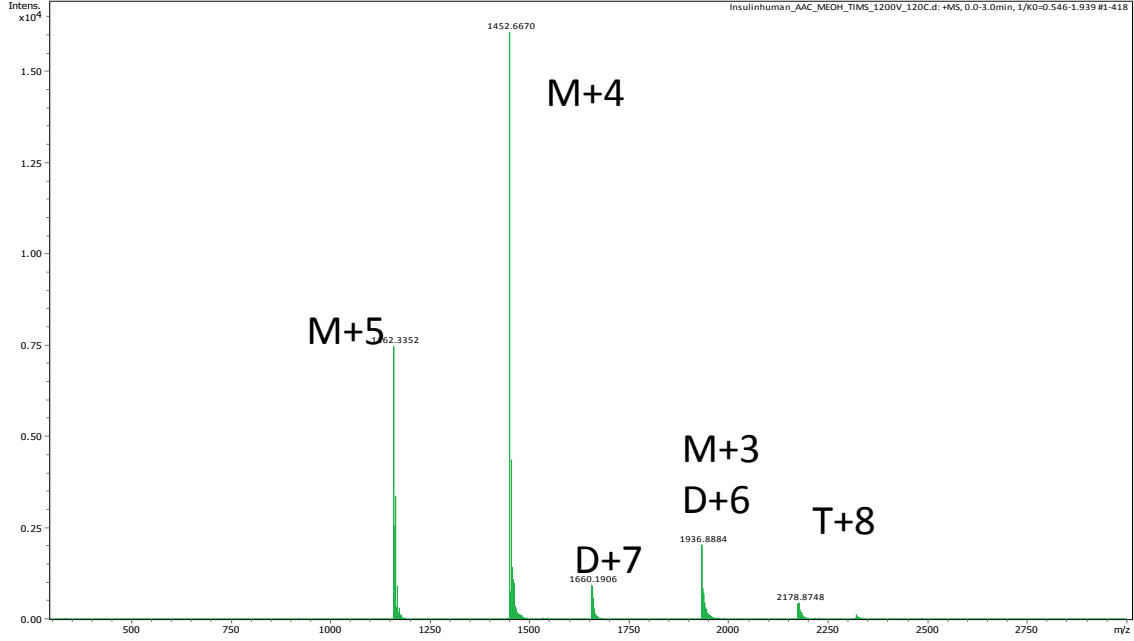
Uçuş zamanlı kütle ayırıcısında iyonlar, iyonları hızlandırıp harekete geçirecek bir enerji uygulanarak “uçurular” [37]. Bu iyonlar, dedektöre ulaşmak için uçuş tüpünden geçmektedir. İyonların uçuş zamanı değerleri  $m/z$  oranlarına bağlıdır. İyonun dedektöre ulaşma süresi  $m/z$  oranının karesi ile doğru orantılıdır. Daha büyük  $m/z$  oranı olan iyon, dedektöre daha geç ulaşmaktadır. TOF, çok yüklü iyonlar için 1.0 Da farklılıktaki izomerleri bile ayırt etme kabiliyeti, iyon seçimi ve hareketlilik analizleri için tercih edilmektedir [31, 37,38].

### **2.2.3. Dedektörler**

Kütle ayırıcısında kütle/yük oranlarına göre ayrılan iyonlar, kütle ayırıcısından geçer ve daha sonra bir dedektör tarafından algılanır ve kullanılabilir bir sinyale dönüştürülür. Dedektörler, iyonların bollukları ile orantılı bir elektrik akımı üretirler [31]. Dedektörler, cihazın beyni olarak isimlendirilebilir. Zayıf sinyallerin seviyesini yükseltme, hızlı yanıt alımı, düşük gürültü, yüksek toplama verimliliği, düşük maliyet, yanıtların dağılımının dar olması, tüm kütleler için aynı yanıt, büyük dinamik aralık, uzun süreli kararlılık, uzun süreli kullanım ve ayrıca yüksek vakum sistemi dışına monte edilmesi en iyi dedektör sistemini oluşturmaktadır [31,39,40].

Dedektörler tarafından oluşturulan sinyal kütle spektrumu şeklinde verilir. Kütle spektrumu, yüklü iyonların  $m/z$  oranlarının değerlerine karşı, bu iyonların bolluklarının grafiğe geçirilmiş halidir.





Şekil 2.8. İnsan insülininin kütle spektrumu.

Şekil 2.8’de verilen, insan insülininin kütle spektrumu, tez çalışmasında, metanol (MeOH) ve amonyum asetat (AAC) ile hazırlanmış insan insülini örneğinin, 1200 V kapiler voltajı ve 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında yapılan analiz ile elde edilmiştir. M+3 ve D+6 iyonları, aynı m/z oranına sahip olmalarından dolayı, spektrumda üst üste gelmiştir. Tez çalışmasında, sonuçlar ve tartışma kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

### 2.3. İyon Hareketliliği – Kütle Spektrometrisi (IM – MS)

Kütle spektrometrisi, moleküler karakterizasyon için en hızlı ve en hassas yöntemlerden biridir. İyonlaştırma yöntemleri, tarama hızı, hassasiyet ve çözünürlükteki iyileştirmeler ile kütle spektrometrisinin kullanım alanları oldukça genişlemiştir [30]. Kütle spektrometrisi, sağlamış olduğu kolaylıklara rağmen, aynı kütle/yük oranına sahip farklı türleri ayırt edememektedir. İyon hareketliliği spektrometrisinin (IMS) kütle spektrometrisi (MS) ile birleştirilmesi ile oluşan yeni cihaz, iyon hareketliliği kütle spektrometrisi (IM – MS), aynı kütle/yük oranına sahip farklı türleri ayırt edebilmesinin yanı sıra, boyutları ve şekillerine göre ayırma işlemi yapabilmektedir [41].

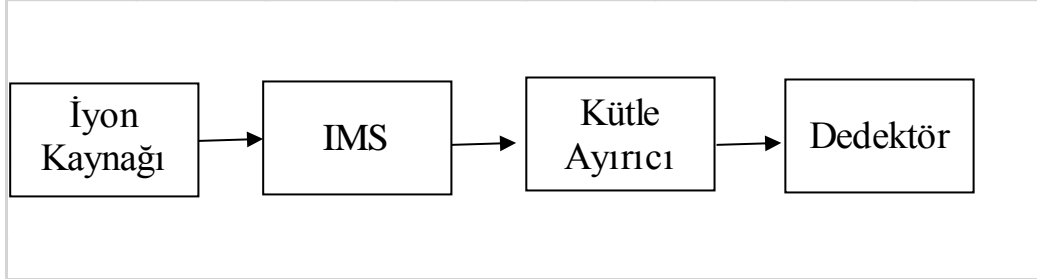
Biyomoleküller ile yapılan çalışmalarda yapısal bilgiye duyulan ihtiyaç artmaktadır. Çünkü tek bir protein, katlanma şekline bağlı olarak birçok farklı işlev ve özelliğe sahip olabilir. Molekülün konformasyonu hakkında bilgi sahibi olmak, konformasyonel

dinamikleri, esnekliği, katlanma mekanizması hakkında bilgi sahibi olmak anlamına gelmektedir. Biyomoleküllerin bu özellikleri hakkında bilgi sahibi olmak, yapı – fonksiyon ilişkilerini, biyolojik aktivitelerini daha iyi anlamak, ilaç tasarımını iyileştirmek ve uygun saklama koşullarını belirlemek için oldukça önemlidir [42]. İyon hareketliliği kütle spektrometrisi ile biyomoleküllerin tüm bu özellikleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir [42].

İyon hareketliliği spektrometrisi (IMS) tekniği, kütle spektrometrisi gibi 19. yüzyıl başlarında, bilim insanları tarafından elektriksel ve manyetik alanların yüklü parçacıklara uygulanmaları ile ayrılmaları ve analiz edilmelerini sağlamak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır [43,44]. IMS, gaz fazındaki iyonları büyüklük/yük ( $\Omega/z$ ) oranına göre ayırmaktadır. Daha sonraki yıllarda sınırlı kullanım alanı olmasından kaynaklı olarak kütle spektrometrisine göre daha az tercih edilir duruma gelmiştir [38]. İlk olarak 1960 yılında McDaniel adlı bilim insanı, kütle spektrometresi ile iyon hareketliliği spektrometresini birleştirerek iyon hareketliliği kütle spektrometresi cihazını tasarlamıştır [45]. Daha önceleri çoğunlukla askeri amaçlar için kullanılan iyon hareketliliği spektrometrisi tekniği, kütle spektrometrik yumuşak iyonlaştırma tekniklerinin geliştirilmesi ile birlikte patlayıcıların, polimerlerin karakterizasyonu ve biyomoleküllerin analizleri gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır [41, 46 - 51].

İyon hareketliliği spektrometresi (IMS), elektrik alanı varlığında, iyonları, iyonlar ile etkileşime girmeyen tampon gazdaki hareketlerine dayanarak ayırır [41]. Sürüklenme tüpü (drift tube), düşük vakum altında ya da atmosferik basınç şartlarında reaksiyona girmeyen tampon gaz (argon, helyum, azot) ile doldurulmuştur. İyonlar, sürüklenme tüpünde, tampon gaz içerisinde hareket ederler. İyonların bu tüpteki hareketlerinin farklılığına göre ayırma işlemi gerçekleştirilir ve türlerin moleküler yapıları hakkında bilgi edinilir [52]. Kompleks analitler ile çalışılırken hızlı ve hassas olması nedeniyle yoğun olarak tercih edilen sistem olan kütle spektrometresi, iyon hareketliliği spektrometresi ile birleştirildiğinde molekölün yapısı hakkında daha detaylı bilgi veren, güçlü bir cihaz haline gelmiştir. Söz konusu elektriksel alanda hareketlilik tabanlı olarak yapılan bir analiz doğal MS analizlerine ek olarak moleküllerin üç boyutlu yapısının elde edilmesini de sağlar. İyon hareketliliği spektrometresi, kütle spektrometresi ile birleştirildiğinde, iyonları kütle/yük oranlarının yanı sıra, bir tampon gazla etkileşimleri temelinde ayıran, moleküler yapıyı araştırmak ve karmaşık numuneleri ayırmak için

kullanılabilen güçlü bir analitik cihaz haline gelmektedir [41, 53,54]. IMS-MS, iyonların bileşim ve yük durumuna bağlı olarak karışımlardan ayrılması, geometrik izomerlerin ayrılması, dinamik aralığın arttırılması ve kimyasal gürültüye karşı ayrımcılığın da dahil olduğu geleneksel MS'e göre birçok avantaj sunar [55 – 60].

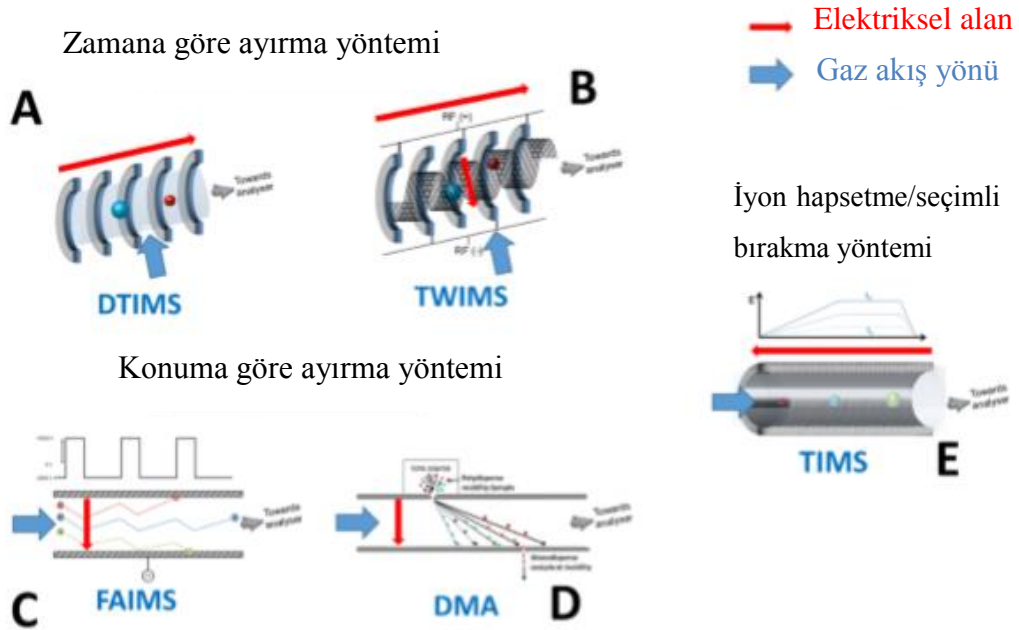


Şekil 2.9. IM- MS cihazının temel bileşenleri [41]

IMS, elektrosprey iyon kaynağında üretilen iyonların, zayıf elektriksel alan varlığında sürükleyici gaz yardımı ile iyon hareketlilik hücreğine gönderilmesi ile başlayan gaz fazında ayırma tekniğidir. IM hücreğinde iyonlar hareketliliklerine göre ayrılırlar. Hareketliliklerine göre ayrılması iyonların büyüklüğü, şekli ve yükü hakkında bilgi vermektedir. Daha sonra IMS ayırıcısının türüne göre iyonun hareketlilik değeri, etkin çarpışma kesitinin (CCS) belirlenmesini sağlamaktadır. CCS, belirli tampon gaz ortamında verilen molekül için iyon şekli ile ilgili fiziksel bir özelliktir [61].

IMS, çalışma prensibine göre, zamana göre ayıran (Time - dispersive methods), konuma göre ayıran (Space – dispersive methods) ve iyon hapsetme/seçimli bırakma (Ion trapping methods) gibi üç temel grupta incelenebilir [61 - 63]. Zamana göre ayırma prensibine göre çalışan IMS, benzer bir yol boyunca sürüklenen iyonların belirli bir noktaya varış süreleri üzerinden veri elde ederek spektrum oluşturur. Zamana göre ayırma prensibine göre çalışan, en çok kullanılan iyon hareketliliği spektrometrisi, sürüklenme tüpü iyon hareketliliği spektrometrisi (Drift Tube Ion Mobility Spectrometry (DTIMS) ve kaydırmalı dalga iyon hareketliliği spektrometrisi (Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry, TWIMS) örnek olarak gösterilebilir [63]. Konuma göre ayırma prensibine göre çalışan IMS, iyonların hareketliliklerindeki farklılıklara dayanarak, iyonları farklı sürüklenme yolları boyunca ayırır. Bu prensibin en önemli noktası, yapılan analizde, voltaj değişikliği taraması yapılarak geniş bir iyon hareketliliği spektrumunun (mobilogram) elde edilebilmesidir. Konuma göre ayırma

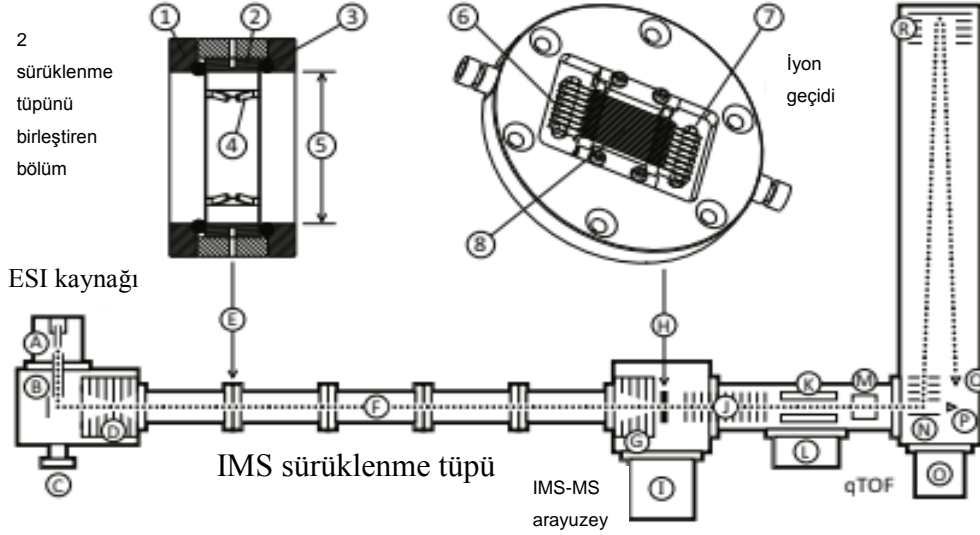
prensibine göre çalışan yöntemlere, alan asimetrik iyon hareketliliği spektrometrisi (Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry, FAIMS), tekdüze alan hareketlilik analizörleri (uniform – field differential mobility analyzers, DMA) ve yeni geliştirilen frekans taramalı iyon hareketliliği seçimi yapan çapraz ayarlı iyon hareketlilik spektrometresi (Transverse Modulation Analyzer, TMMIS) örnek olarak verilebilmektedir [64 - 71]. İyon hapsedme/seçimli bırakma prensibine göre çalışan IMS tekniğinde iyonlar, basınç varlığında elektriksel alan yardımı ile hapsedildikten sonra hareketliliklerine göre seçimli olarak birbirlerinden ayrılmaktadır [62- 64]. Bu yöntem, iyonların kendilerine uygulanan elektriksel alan sayesinde, hareketlerinin kontrol edilebilmesi ile kullanılabilir duruma gelmiştir. Bu tez kapsamında iyon hapsedme/seçimli bırakma yöntemi ile çalışan tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometresi (Trapped Ion Mobility Spectrometry, TIMS) ile çalışılmıştır.



Şekil 2.10. IMS çeşitlerinin şematik gösterimi (A,B) Zamana göre ayırma yöntemi,(C,D) Konuma göre ayırma yöntemi, (E) İyon hapsedme/seçimli bırakma yöntemi [61].

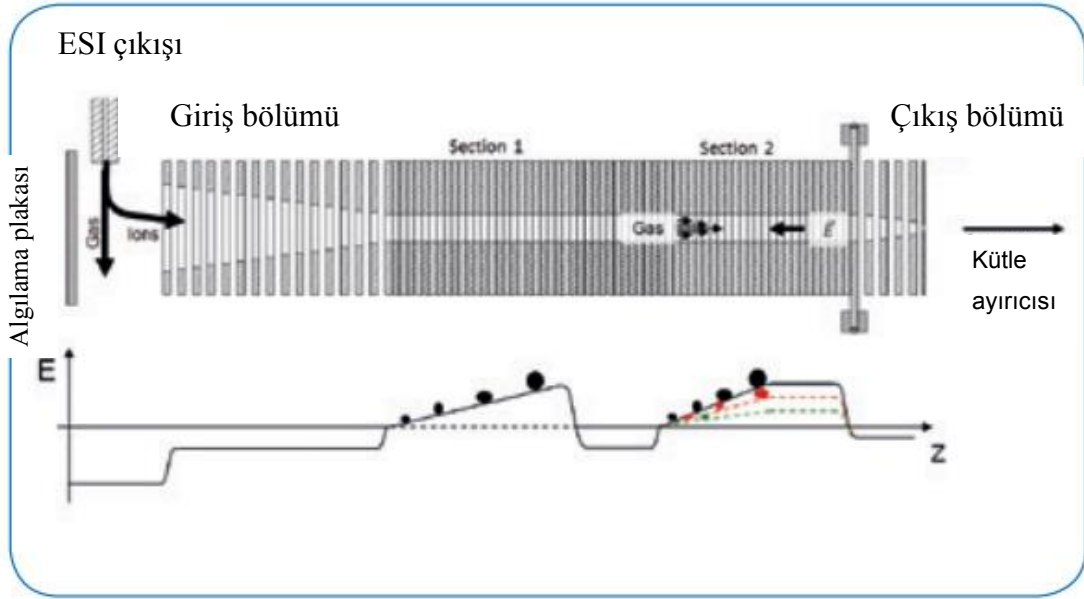
### 2.3.1. Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Spektrometrisi (TIMS)

İyon hareketliliği spektrometreleri, elektrik alanı varlığında, iyon kaynağından gönderilen iyonları, iyonlar ile etkileşime girmeyen, iyon hareketliliği tüpünde bulunan sürükleyici gazdaki hareketlerine dayanarak ayırmaktadır. IMS sürüklenme tüpünde (drift tube), gaz fazındaki iyonlar, büyüklük ve yüklerine göre ayrılmaktadır [72,73].



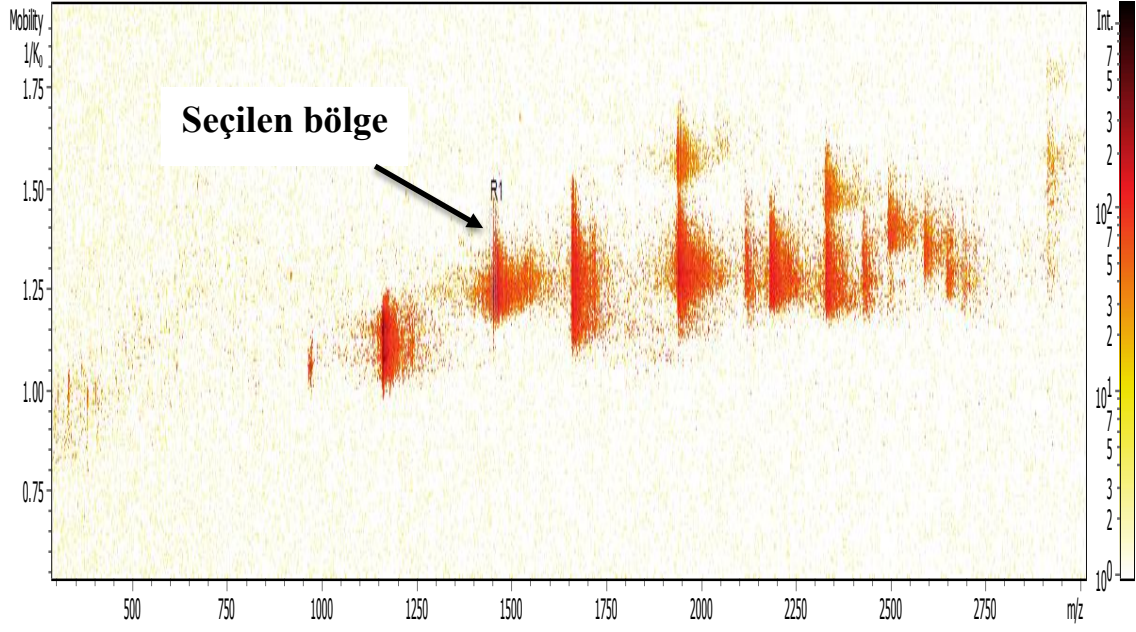
Şekil 2.11. TIMS cihazının şematik gösterimi [74].

TIMS, geleneksel IMS çeşitlerinin tersi şeklinde çalışmaktadır. Geleneksel IMS tekniklerinde, iyonlar, sürüklenme tüpünde, sabit tampon gaz içerisinde elektriksel alan sayesinde sürüklenmektedir. TIMS tekniği ise, sürüklenme tüpünde hareket eden tampon gazın içerisindeki iyonları sabit tutmak için elektriksel alanı kullanmaktadır [74]. Ayırıcı ünitesinin iyonları sabit olarak tutmaya yetecek büyüklükte olması ve gaz yoğunluğunun kullanıcının belirleyeceği değerlerde olabilmesi, daha rahat analize imkan sağlamaktadır [74]. Aynı zamanda, diğer IMS teknikleri ile karşılaştırıldığında daha iyi çözünürlükte IMS ayırımı yapabilmektedir [75, 76].

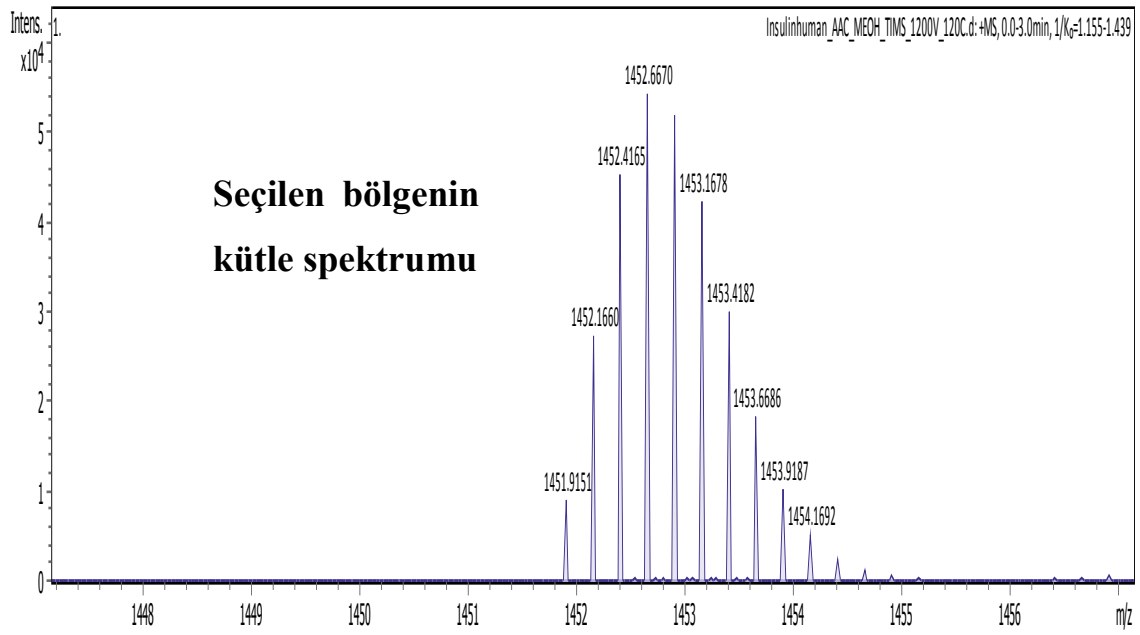


Şekil 2.12. Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisinin (TIMS) çalışma prensibinin şematik gösterimi [77].

Elektrosprey iyon kaynağında üretilen iyonlar IMS sürüklenme tüpüne (drift tube) gönderilir. Sürüklenme tüpünün çıkışında bulunan iyon geçidi (ion gate), hareketlilik seçimli iyonların geçişine izin verir. Dört kutuplu kütle ayırıcısı ve çarpışma birimi, kütle/yük ya da hareketlilik/yük için seçilen iyonların çarpışma kaynaklı ayrışmalarına izin veren bir düzenleme ile, sürüklenme tüpü ile uçuş zamanlı kütle analizörü arasında yerleştirilmiştir [74]. TOF kütle ayırıcısının, çok yönlü iyonlar için bile kütle olarak 1.0 Da farklılıklarını çözebilmesi, iyon seçimi ve hareketlilik analizi için oldukça önemlidir. Tüpte bulunan sürükleyici gazın yanı sıra ters yönden gelen zayıf elektriksel alan, iyonların hareket etmelerini zorlaştırmaktadır (trapped). Elektriksel alan ve sürükleyici gaz yardımı ile iyonlar, büyüklük ( $CCS$ ,  $\Omega$ ) ve yüklerine göre ayrılır. Daha sonra, iyonlar hareketliliklerine göre, hareketliliği daha düşük olan daha önce olmak üzere, dört kutuplu ve uçuş zamanlı kütle ayırıcısı sistemlerine gönderilir. Kütle ayırıcısı iyonları kütle/yük oranlarına göre ayırır, iyonlar dedektöre iletilir ve spektrum elde edilir (Şekil 2.13, şekil 2.14) [74, 78].



Şekil 2.13. İnsan insülininin iki boyutlu ısı haritası.



Şekil 2.14. Şekil 2.13'te seçilen bölgenin kütle spektrumu.

### 2.3.2. Etkin Çarpışma Kesiti (Collision Cross Section, CCS)

İyon hareketlilik spektrometrisi tekniği, gaz fazındaki iyonların, elektriksel alanda sürükleyici gaz yardımı ile büyüklüklerine, şekillerine ve yüklerine göre ayrılması prensibine dayanır. IMS tekniğinin en önemli özelliği, analiz edilen molekülün etkin çarpışma kesitinin (Collision cross section, CCS), belirlenmesini, yani molekülün üç boyutlu yapısı hakkında bilgi alınabilmesini sağlamasıdır. CCS, belirli gaz ortamında, bir molekül iyonunun sahip olduğu konformasyonu ile ilgili fiziksel bir özelliktir ve iyonların yükleri belirlendiğinde, CCS değeri (A2) olarak hesaplanmaktadır [52, 53, 74,79].

Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisi tekniğinde, iyonların hareketli gaza karşı sabit tutulması için elektriksel alan kullanılmaktadır. İyonların dedektöre varış zamanlarının ölçülmesi, incelenen örneklerin konformasyonel aralığını yansıtır ve bu zaman değerleri Mason Schamp denklemi ile etkin çarpışma kesitine (CCS) dönüştürülebilir [72,73].

İyonların sürüklenme hızı,  $V_d$  iyon hareketliliği sabiti  $K$  ve uygulanan elektrik alan,  $E$ ;

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

eşitliği ile verilir.  $K$ , iyonun sürükleyici gaz ile etkileşiminin fonksiyonudur. Çok fazla parametreye bağlı olan bu etkileşimi basitleştirmek gerekirse, 2 numaralı eşitlikte gösterilen, indirgenmiş hareketlilik sabiti,  $K_0$  kullanılabilir.

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

$K_0$  kütle spektrometresi ile iyon hareketlilik spektrometresi birleştirildiğinde önemli bir bilgi durumuna gelmektedir, kütle/yük oranı ( $m/z$ ) iyonun kimyasal sınıfını gösterir ve Mason Schamp denkleminde CCS hesaplanırken direkt kullanılabilir [79].

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



z; iyon yükü, e; elektron yükü, kb Boltzman sabiti ve  $\mu$ , indirgenmiş kütlelerin kısaltılarak yazılmasıdır. K yerine K0 yazıldığında, denklemde bulunan gaz yoğunluğu birimi olan N denklemden çıkarılır.

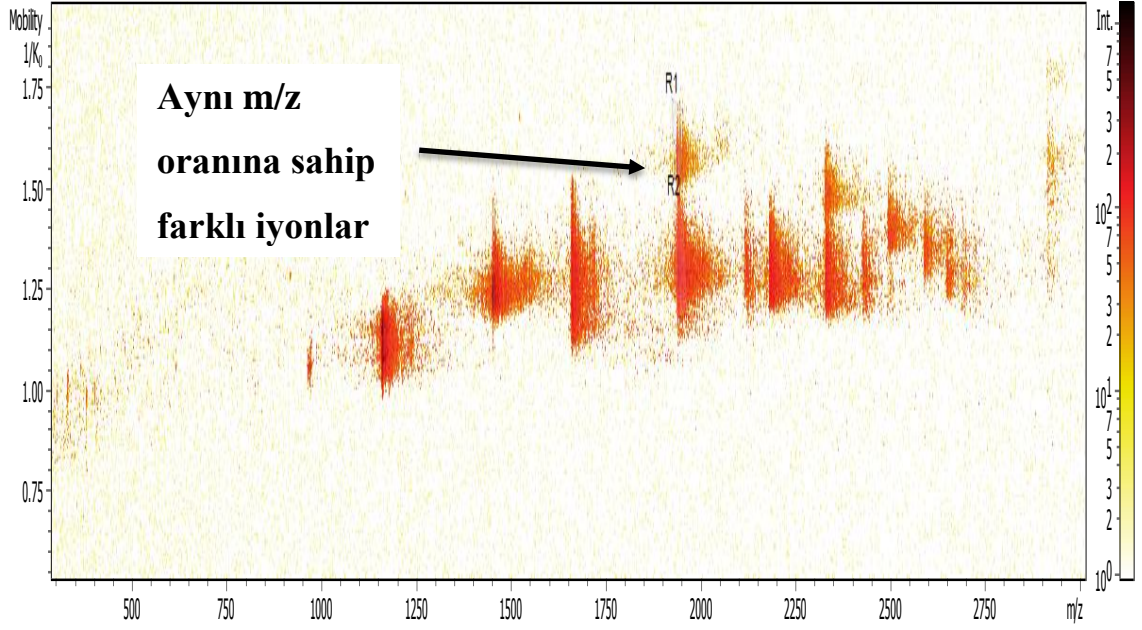
$$CCS = \frac{3ze}{16} \frac{1}{K_0} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_b T}} \quad (4)$$

Denklemdaki bütün sabitler hesaplandığında en son (5) eşitliği elde edilir.

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

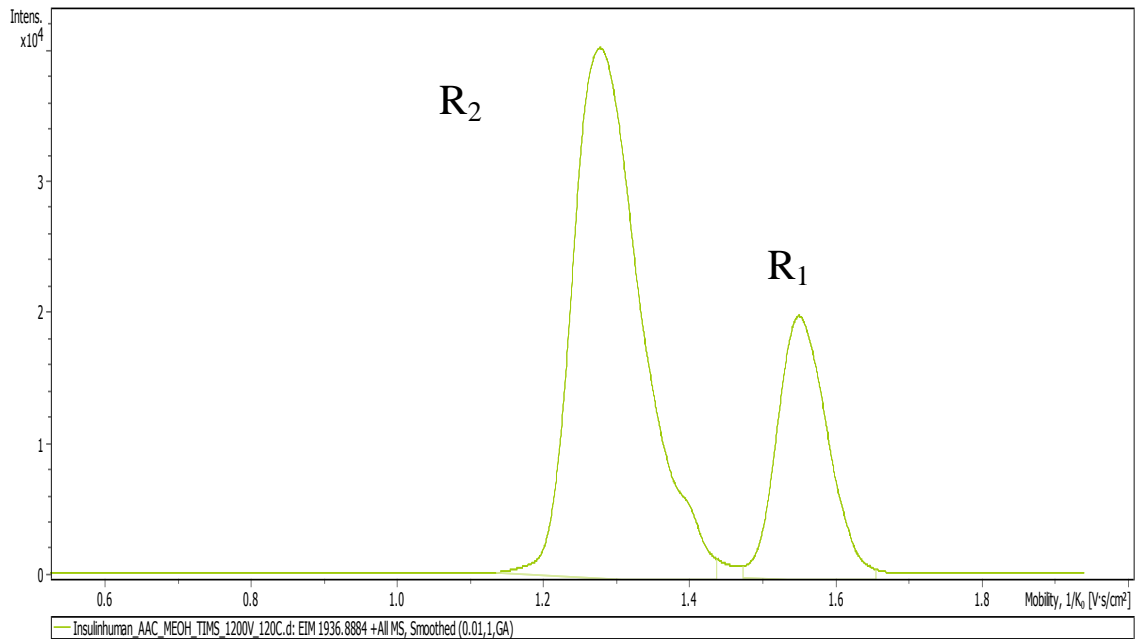
z; iyon yükü, hareketlilik sabiti K0, iyon kaynağı sıcaklığı T, iyon kütlesi M, sürükleyici gaz kütlesi m, CCS değerinin hesaplamak için yeterlidir. K0 ve CCS analit iyonu ve sürükleyici gaz arasındaki etkileşimin bir özelliğidir ve molekülün üç boyutlu yapısı hakkında bilgi verir [75, 79 - 83].

Aynı m/z oranına sahip iki molekül, büyüklükleri ve şekilleri farklı olduğu için farklı hızlarda hareket etmektedirler. İyon hareketliliği spektrometrisi, bu farklılıktan yararlanarak molekülleri ayırt edebilmektedir. Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisi tekniğinde, iyonlara uygulanan elektriksel alan, küçük iyonlarda daha fazla etkilidir. Küçük iyonu, bulunduğu ortamda daha fazla tutmaktadır. TIMS cihazında, daha büyük CCS değerine sahip büyük iyon daha hızlı hareket ederken, daha küçük CCS değerine sahip olan küçük iyon, ters yönden uygulanan elektriksel alan tarafından daha uzun süre hapsedilmektedir. Buna göre, daha büyük CCS değerine sahip olan iyonlar, sürüklenme tüpünü daha önce terk eden ve daha önce analiz edilen iyonlardır (Şekil 2.15, şekil 2.16)



Şekil 2.15. İnsan insülininin, kütle/yük oranı aynı olan iki farklı iyonunun ısı haritasında gösterimi.

Hareketlilik sabiti ve kütle/yük oranına göre iki boyutlu gösteriminde, R1 olarak belirtilmiş olan iyonun, hareketlilik sabitinin ( $1/K_0$ ) daha yüksek, CCS değerinin daha düşük olduğu gözlenmektedir (Şekil 2.16). R2 olarak gösterilen iyonun, hareketlilik sabiti daha düşük, iyonun CCS değeri daha büyüktür (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Şekil 2.15'te gösterilen iki farklı iyonun mobilogramlarının gösterimi.

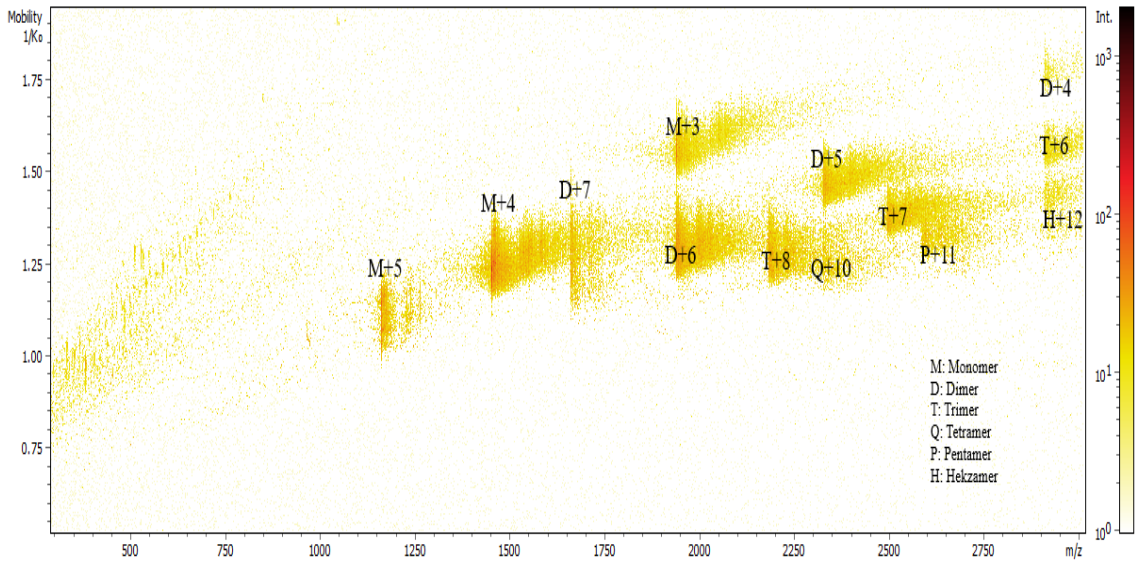
### 2.3.3. TIMS ile Protein Analizleri

Proteinlerin hareketli yapıda olmaları, yapısal değişikliklere kolaylıkla uğramaları ve fizyolojik koşullarda düşük miktarda bulunmalarından dolayı yapısal analizleri oldukça zorludur. Belirli fonksiyonlara sahip olabilmek için yapılarında kolaylıkla değişiklik meydana gelebilmektedir. Bu durum, proteinlerin yapısal bilgilerinin ve yapı – fonksiyon ilişkilerinin tam olarak anlaşılması için deneysel yöntemler geliştirilmesinin çok önemli olduğunu göstermektedir. Protein analizlerinde kütle spektrometrisi, elektrosprey iyon kaynağı, uçuş zamanlı kütle ayırıcı kullanımı ile birlikte çok güçlü bir analitik teknik durumundadır. Kütle spektrometrisinin iyon hareketlilik spektrometrisi ile birleştirilmesi sonucunda biyomolekül analizleri yeni bir boyut kazanmıştır. İyon hareketliliği spektrometrisi, iyonları büyüklük ve şekline göre ayırdığı için, biyomolekül analizlerinde daha fazla yapısal bilgiye ulaşılmaya başlanmıştır [41, 49, 54,55,61,84]. Proteinin üç boyutlu yapısı, biyolojik fonksiyonu için oldukça önemlidir. IM – MS tekniği, proteinin üç boyutlu yapısı, şekli, büyüklüğü, kütlesi gibi birçok özelliği hakkında bilgi vermektedir. TIMS, biyomoleküller ile çalışmak için en uygun koşulların sağlandığı bir cihaz olmuştur. Yüksek hassasiyet, seçicilik ve yüksek ayırma gücü gibi özelliklerin yanı sıra ayırıcının iyonları sabit tutmaya yetecek büyüklükte olması ve sürükleyici gaz tütünün kullanıcının belirleyeceği uzunlukta olması daha rahat analiz olanağı sağlamaktadır [74].

Proteinlerin konformasyonu ve oligomerik dağılımının belirlenmesi, yapı ve fonksiyon arasındaki ilişkinin anlaşılması için büyük önem taşımaktadır. Proteinlerin oligomerik dağılımlarının belirlenmesi için birçok analitik teknik mevcuttur. Bu teknikler, örnek hazırlama ve derişimi, düşük ayırıcılık özelliği ve hazırlanan çözeltinin içeriği gibi birçok parametreye bağlıdır ve kolay uygulanabilir değildir [85,86]. Kütle spektrometrik teknikler, yüksek ayırıcılık gücü, hassasiyet gibi birçok avantaj sağlamasına rağmen proteinlerin oligomerik dağılımının analizinde yetersiz kalmaktadır. Aynı m/z oranına sahip farklı oligomerik yapıların analizinde kütle spektrometrik teknikler tek başlarına yeterli değildir. Bu yüzden bu tür analizlerde iyon hareketliliği spektrometrisi ile birleştirilmiş kütle spektrometrisi sistemleri kullanılmaktadır [87]. İyon hareketliliği – kütle spektrometrisi analizleri ile ayırma yapılarak aynı zamanda iyonları ve oligomerik yapıları tanımlama işleminin de yapılmaktadır. Birçok iyon hareketlilik spektrometrisi arasından, yüksek hassasiyet ve yüksek çözünürlük sunmasının yanı sıra, uygulama

kolaylığı sağlaması, TIMS – MS cihazını konformasyon ve oligomerik dağılım çalışmalarında en çok tercih edilen cihaz konumuna getirmiştir [61,88].

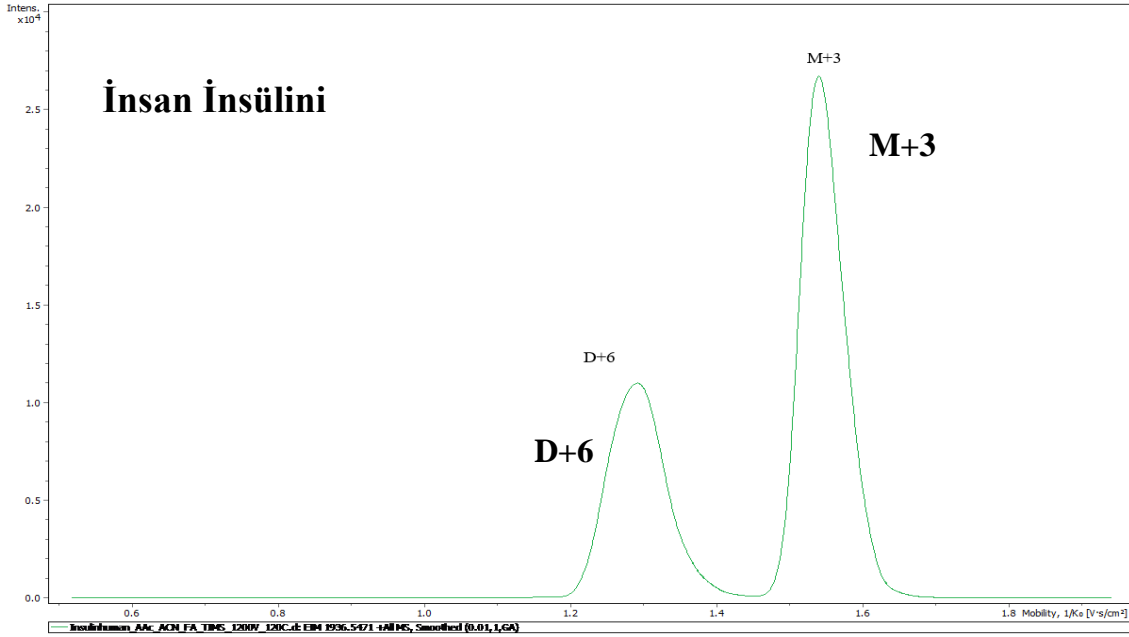
Tez kapsamında yapılmış olan çalışmalarda kullanılan TIMS – TOF – MS (Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Spektrometrisi – Uçuş Zamanlı – Kütle Spektrometrisi) cihazından elde edilen veriler, Data Analysis (Bruker, Daltonics) programı ile analiz edilmektedir. Data Analysis, cihazın işlediği verileri inceleme, düzenleme, dönüştürme ve modelleme programıdır. Analiz sırasında kaydedilen tüm verileri görselleştirmektedir. Data Analysis programı, iki boyutlu ısı haritaları (heat map), mobilogramlar ve kütle spektrumlarında yüksek çözünürlüklü iyon hareketlilik verilerinin etkileşimli analizini sağlamaktadır [89 - 91].



Şekil 2.17. İnsan insülininin Amonyum asetat (AAC) + Asetonitril (ACN) + Formik Asit (FA) (v/v: 50:50:0.1) çözeltisinde, 1200 V kapiler voltajı ve 120 °C iyon kaynağı sıcaklığındaki IM - MS analizlerinden elde edilen iki boyutlu ısı haritası.

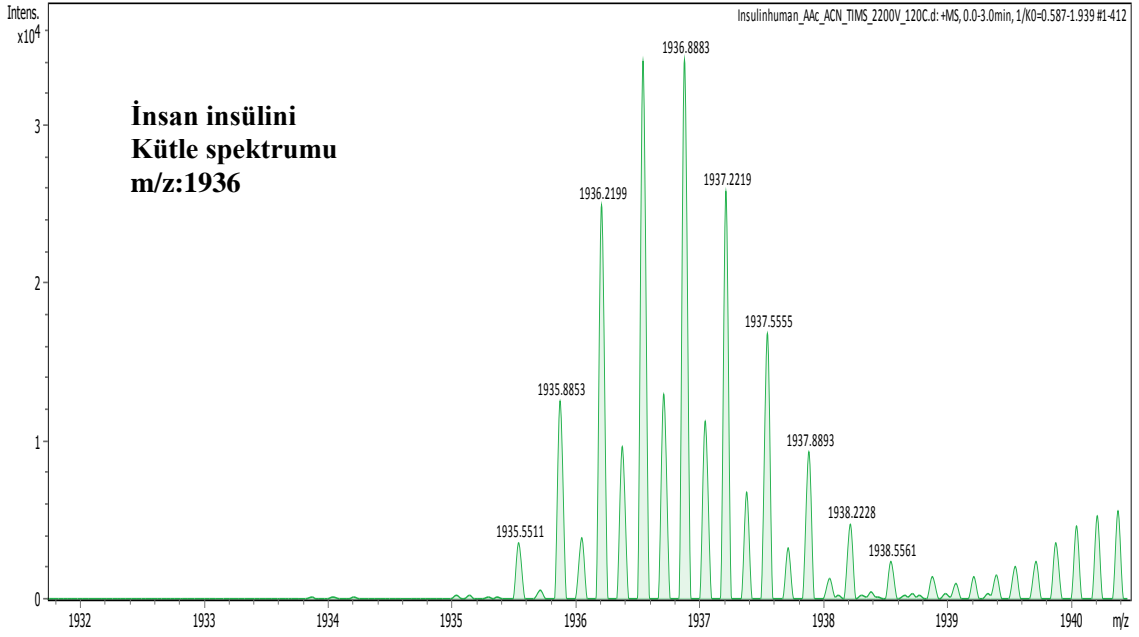
İki boyutlu ısı haritasında, analiz boyunca elde edilen bütün iyonların kütle/yük oranlarının 1/K0 değerlerine göre değişimleri, iki boyutlu olarak renkli bir şekilde gösterilmektedir. Bu gösterimlerde analiz edilen molekülün iyonlarının oligomerik yük dağılımları gözlenmektedir. Aynı m/z oranına sahip iki iyon (örneğin, 3+ yüke sahip monomer, (M+3), +6 yüke sahip dimer (D+6) için veri ayırımı çok net bir şekilde fark edilmektedir. Sadece kütle spektrometrisi ile yapılan analizlerde bu iyonların ayırt

edilebilmeleri mümkün değilken, şekil 2.18’de gösterilen söz konusu iyonlar, ancak IMS tekniğinin kullanılması ile ayırt edilebilmiştir [92].



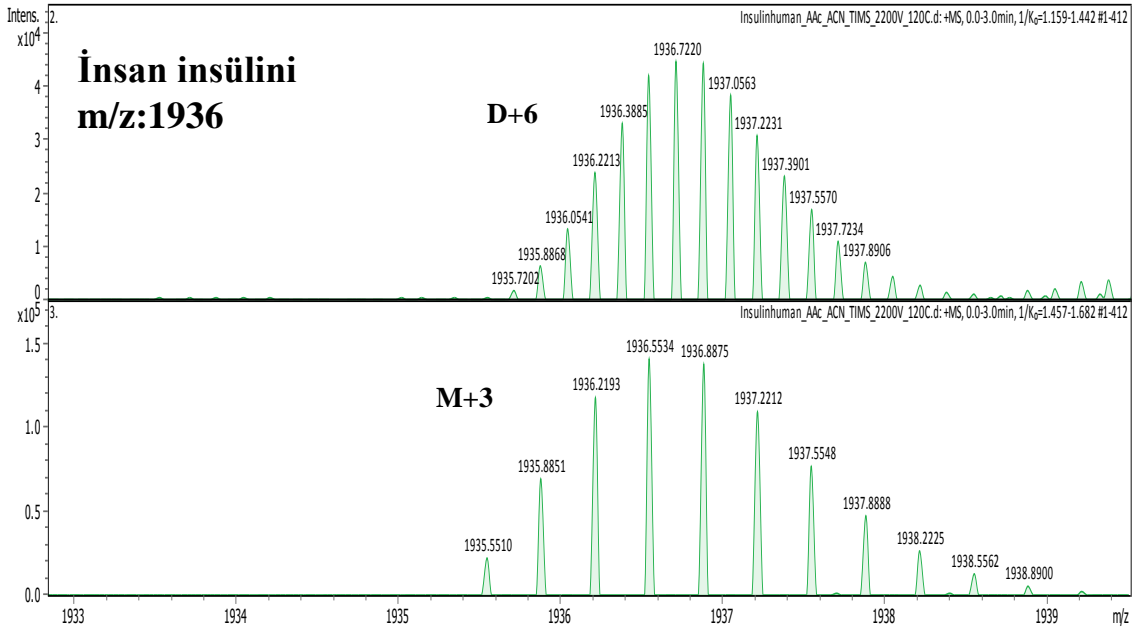
Şekil 2.18. İnsan insülininin AAC+ACN+FA çözeltisinde 1200V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında, +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) iyonlarının (m/z: 1936,7220) mobilogramı.

Şekil 2.18’te görüldüğü gibi aynı m/z oranına sahip iki farklı oligomerik yapı, IMS analizi ile kolaylıkla gözlenebilmiştir. İnsan insülininin amonyum asetat (AAC), asetonitril (ACN) ve formik asit (FA) (50:50:0.1) ile hazırlanan çözeltisinde, +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) iki farklı iyonun olduğu iyon hareketlilik spektrometrisi ile gözlenmiştir. m/z oranı 1936,7220 olan bu iki iyon, şekil ve yüklerinin farklı olmasından kaynaklı iki farklı mobilogram vermiştir. TIMS tekniğinin çalışma prensibine dayalı olarak, büyük olan iyon, yani CCS değeri daha büyük olan iyon daha önce gelmektedir.



Şekil 2.19. İnsan insülini (m/z:1936,7220) iyonunun kütle spektrumunun gösterilmesi.

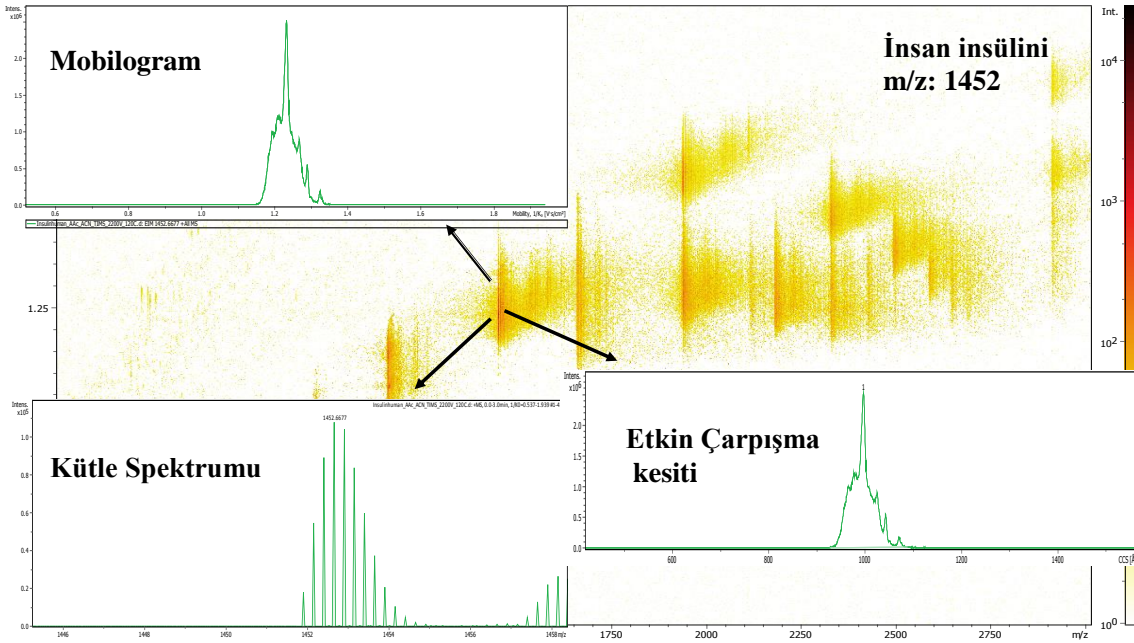
Kütle spektrometrisi oligomerik dağılımlarda aynı m/z oranına sahip farklı türlerin analiz edilmesinde yetersiz kalmakta, iki farklı spektrum yerine, bir tane spektrum oluşturmaktadır (Şekil 2.19). Aynı m/z oranına sahip olsa da yapılarında farklılık gösteren iyonlar IMS yardımı ile ayrılmaktadır (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. İnsan insülininin +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) (m/z:1936,7220) iyonlarının kütle spektrumlarının gösterilmesi.

Şekil 2.20’te, Data Analysis programı ile seçilen iyonun ( $m/z$ : 1936,7220) daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve üst üste binmiş iki farklı iyonların kütle spektrumlarının gösterilmesidir. Şekil 2.19’te gösterilen spektrum, iyon hareketliliği spektrometrisi ile çalışılmadığında elde edilen spektrumdur. İyon hareketliliği spektrometrisi ile analiz edildiğinde, iyon daha ayrıntılı analiz edilmiş olup, hakkında daha fazla bilgi elde edilmiştir. İki farklı iyonun spektrumu olduğu iyon hareketliliği spektrometrisi sayesinde belirtilmiştir.

IMS analizlerinde iyonun mobilogramı, etkin çarpışma kesiti (CCS), ve kütle spektrumu gibi veriler aynı anda elde edilebilmektedir.



Şekil 2.21. İnsan insülininin iki boyutlu ısı haritasında seçilmiş +4 yüklü monomer iyonunun ( $m/z$ :1452,6677) mobilogramının, etkin çarpışma kesitinin (CCS) ve kütle spektrumunun gösterimi.

Şekil 2.21’de insan insülininin AAC+ACN+FA asit çözeltisinde, 1200 V kapiler voltaj ve 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında +4 yüklü monomer ( $m/z$ :1452,6677) iyonunun mobilogramı, kütle spektrumu ve etkin çarpışma kesiti gösterilmiştir. İyon hareketliliği spektrometrisinde, analiz edilen örnekte, istenen iyonun tüm verileri (mobilogram, CCS, kütle spektrumu) daha ayrıntılı şekilde incelenebilmektedir.

İnsülin hormonu, çevresel şartlardan kolay etkilenen, insan hayatı için oldukça önemli bir hormondur. İnsan vücudunda şeker metabolizmasını düzenleyen insülin hormonu,

monomer, dimer, tetramer ve hegzamer gibi birçok oligomerik yapıya sahiptir. İnsülin hormonu, hegzamerik yapı oluşturmaya eğilimlidir ve bu yapıda daha karardır. Ancak, kan şekerini düzenlemede monomerik ve dimerik yapıları daha etkilidir. Farklı koşullar altında meydana gelen değişimlerin, insülin hormonunun yapısında ve fonksiyonları üzerinde etkisini araştırmak ve daha iyi tedavi yöntemleri sunmak için hormonu çok iyi bilmek gerekmektedir. Bu amaçla, insülin molekülünün üç boyutlu yapısı hakkında daha detaylı bilgi sahibi olmak için iyon hareketliliği kütle spektrometrisi ile çalışılmıştır. Kütle spektrometrisi, molekülleri nitelendirmede oldukça güçlü bir analitik tekniktir. Ancak, molekülün şekli ve büyüklüğü hakkında bilgi almak, sadece kütle spektrometrisi ile mümkün değildir. Bu sorun, iyon hareketliliği kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş kütle spektrometrisi ile çözülmüştür.

Daha iyi ayırım gücü ve hassasiyet sunması ile tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisi – kütle spektrometrisi (TIMS - MS) tercih edilen çalışmamızda, insülin hormonunun oligomerik yapısı hakkında daha detaylı bilgi almak için, cihazın parametreleri (kapiler voltajı, iyon kaynağı sıcaklığı) ve çözücü değiştirilmiştir. Bu yapılan çalışma ile, insülin molekülünün, konformasyonel özelliklerinin belirlenmesi, yapı – fonksiyon ilişkilerinin analiz edilebilmesi amaçlanmıştır. Şeker hastaları için hazırlanan insülin molekülünün, etki etme süresine göre yapısında değişiklikler yapılmaktadır [15]. Hızlı etki eden insülin preparatlarında, kan şekerini düşürmede daha etkili olan monomer yapılar daha fazla bulunmaktadır. Ancak insülin molekülünün monomer yapıda kararlı olmayıp, hegzamerik yapı oluşturma eğilimi, ilaçların etki mekanizmasını düşürmektedir. Bu çalışma ile, insülin hormonunun oligomerik yapılarının, değişen parametrelerden nasıl etkilendiği araştırılmıştır.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

İnsan insülini (HIns, Mw~5808 Da), Sigma Aldrich firmasının ürettiği, bakterilerden elde edilen amino asit zincirinin enzimatik reaksiyon ile insülin formunun oluşturulması ile elde edilmiştir (rekombinant DNA teknolojisi ile). Sığır insülini (BIns, Mw~5733,49 Da, sığır pankreas hücresinden), domuz insülini (PIns, Mw~5777,49 Da, domuz pankreas hücresinden), metanol (MeOH, CHROMASOLV, ≥%99.9), asetonitril (ACN, CHROMASOLV, ≥%99.9), formik asit (FA, %98-100), amonyum asetat (AAC) Sigma Aldrich (St Louis, MO, ABD) firmasından satın alınmıştır. Örnekler, yüksek saflıkta çözücüler kullanılarak hazırlanmıştır. Çözeltiler hazırlanırken kullanılan deiyonize su, Expe-Ultrapure Water System (Mirae St Co., Güney Kore) cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

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

IM- MS analizleri, elektrosprey iyon kaynağı ve TIMS adı verilen iyon hapsedme/seçimli bırakma prensibine göre çalışan TIMS – MS (Trapped Ion Mobility Spectrometry – Mass Spectrometry, Bruker Daltonics, Germany) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analizlerde sürükleyici gaz olarak yüksek saflıkta azot gazı kullanılmıştır. Analiz edilen insülin çözeltileri 1.0 mg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Analizlerde çözücü olarak su ile 10 mM derişiminde amonyum asetat (AAC) çözeltisi hazırlanıp, asetonitril (ACN), ve metanol (MeOH) çözücülerini ile 50:50 (v:v, AAC/ACN, AAC/MeOH) bileşimindeki karışımları kullanılmıştır. Çözelti karışımları içerisine hacimce yaklaşık % 0.1 oranında formik asit (FA) eklenerek de analizler yapılmıştır. Oda sıcaklığında hazırlanan çözeltiler, TIMS - TOF - MS cihazına 5.0 µL/dk akış hızıyla direkt infüzyon tekniği kullanılarak gönderilmiş ve genel olarak 3 dakika boyunca veriler kaydedilmiştir. İnsülin hormonu, çevresel şartlardan kolay etkilenen çok hassas bir hormon olduğu için analizler bekletilmeden yapılmıştır [14]. Her analiz öncesinde standart türler kullanılarak kütle ve etkin çarpışma kesiti kalibrasyonları yapılmıştır. Analizler, her çözelti için, iyon kaynağı sıcaklığı 120 °C’de sabit tutarak, kapiler voltajı 1000 V değerinden başlayıp 200 birim artırarak 3000 V’a kadar ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, aynı şekilde hazırlanan çözeltiler, kapiler voltajı 1200 V’da sabit tutup iyon kaynağı sıcaklığı, 60 °C’den başlayıp sıcaklık 20 birim artırılarak, 320 °C’ye kadar çıkarılıp, insülin çeşitlerinin analizi yapılmıştır.

Kapiler voltajı, iyon kaynağı sıcaklığı ve çözücü değişiminin üç farklı insülin türünün moleköl yapısı üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Veri analizleri, Bruker Daltonics tarafından sağlanan Data Analysis 5.0 programıyla yapılmıştır.

## 4. TARTIŞMA VE YORUM

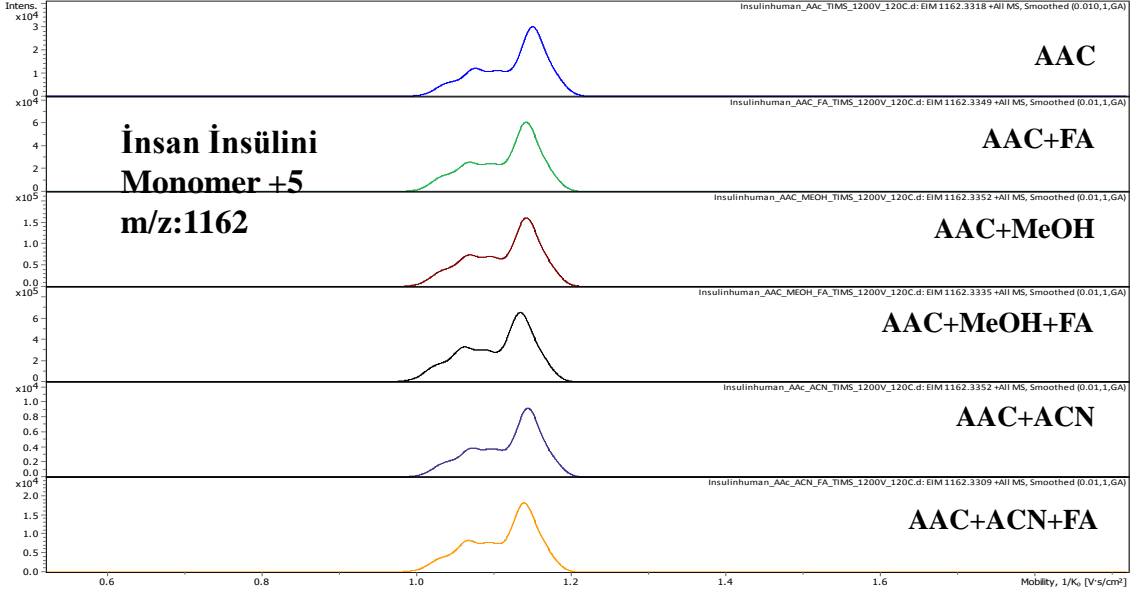
### 4.1. İnsan İnsülininin TIMS-TOF-MS ile Analizi

Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisi – kütle spektrometrisinde (TIMS – MS) kullanılan elektrosprey iyon kaynağı parametreleri ve çözücü değişimlerinin, insülin molekülünün konformasyonu üzerinde etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçlarla aşağıdaki çalışmalar adım adım gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan, enzimatik reaksiyon ile elde edilen insan insülini, Hİns, yaklaşık 5808 Da ağırlığındadır. İnsan insülinin, amonyum asetat (AAC), formik asit (FA) eklenmiş amonyum asetat, asetonitril (ACN): amonyum asetat (50:50, v/v) karışımı ve formik asit eklenmiş çözeltisi, metanol (MeOH): amonyum asetat ( 50:50, v/v) karışımı ve formik asit eklenmiş çözeltisi ile analizleri yapılmıştır. Hİns analizleri, çözücü türü, kapiler voltajı ve iyon kaynağı sıcaklığı parametrelerinin değiştirilmesi ile yapılmıştır. Analizler, her çözelti için, iyon kaynağı sıcaklığı 120 °C’de sabit tutularak, kapiler voltajı 1000 V değerinden başlayıp 200 birim artırarak 3000 V’a kadar ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, aynı şekilde hazırlanan çözeltiler, kapiler voltajı 1200 V’da sabit tutulup iyon kaynağı sıcaklığı, 60 °C’den başlayıp 20 birim artırılarak, 320 °C’ye kadar çıkarılıp analiz edilmiştir. Tez çalışmalarının bu kısmında kapiler voltajı, iyon kaynağı sıcaklığı ve çözücü değişiminin insan insülininin belirli iyonlarının konformasyonları üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir.

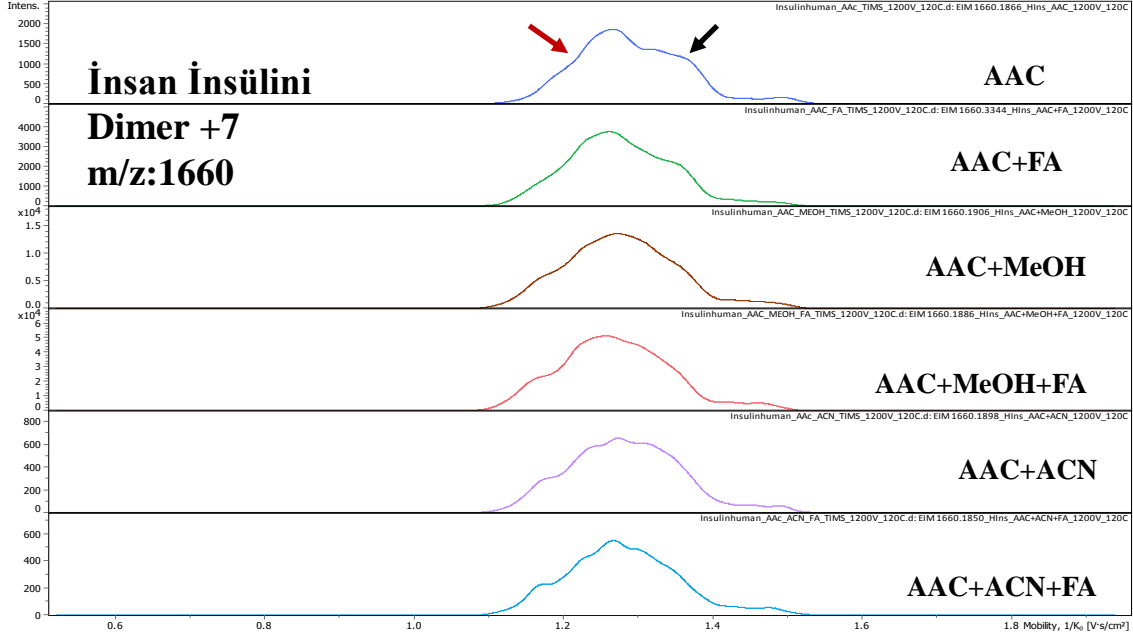
#### 4.1.1. İnsan İnsülininin Konformasyonu Üzerinde Çözücü Etkisi

Amonyum asetat (AAC), formik asit (FA) eklenmiş amonyum asetat, asetonitril (ACN):amonyum asetat (50:50, v/v) karışımı ve formik asit eklenmiş çözeltisi, metanol (MeOH):amonyum asetat ( 50:50, v/v) karışımı ve formik asit eklenmiş çözeltisi ile hazırlanan insan insülini örnekleri TIMS-TOF-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Analizler, kapiler voltajı 1200 V, iyon kaynağı sıcaklığı 120 °C’de gerçekleştirilmiştir.

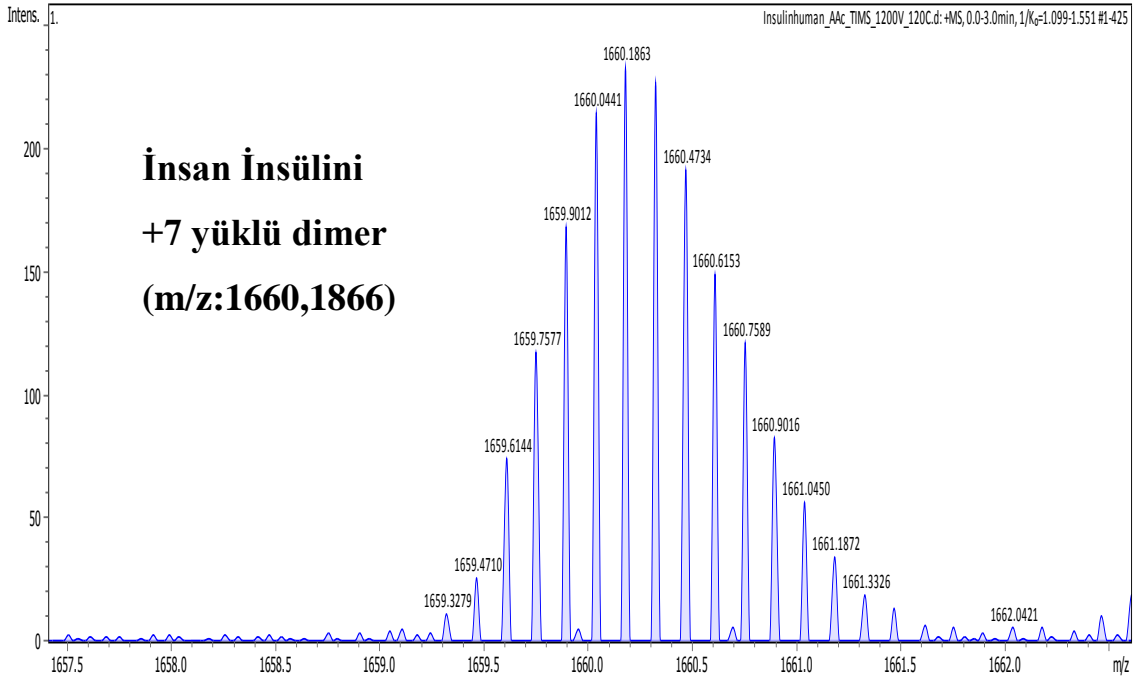


Şekil 4.1. Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü monomer (M+5, m/z:1162,3318) iyonuna ait mobilogramlar.

Farklı çözücülerle hazırlanan insan insülini örneğinin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen tüm iyonlar incelendiğinde, çözücü değişimi sonucunda monomerik haldeki iyonların konformasyonel özelliklerinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.1). Bu durum, çözücü değişiminin monomer iyonlarının yapılarını (M+5, M+4 vb.) etkilemediğini göstermektedir. Bu nedenle, çözücü türünün dimer veya daha büyük yapıdaki iyonların konformasyonları üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır.



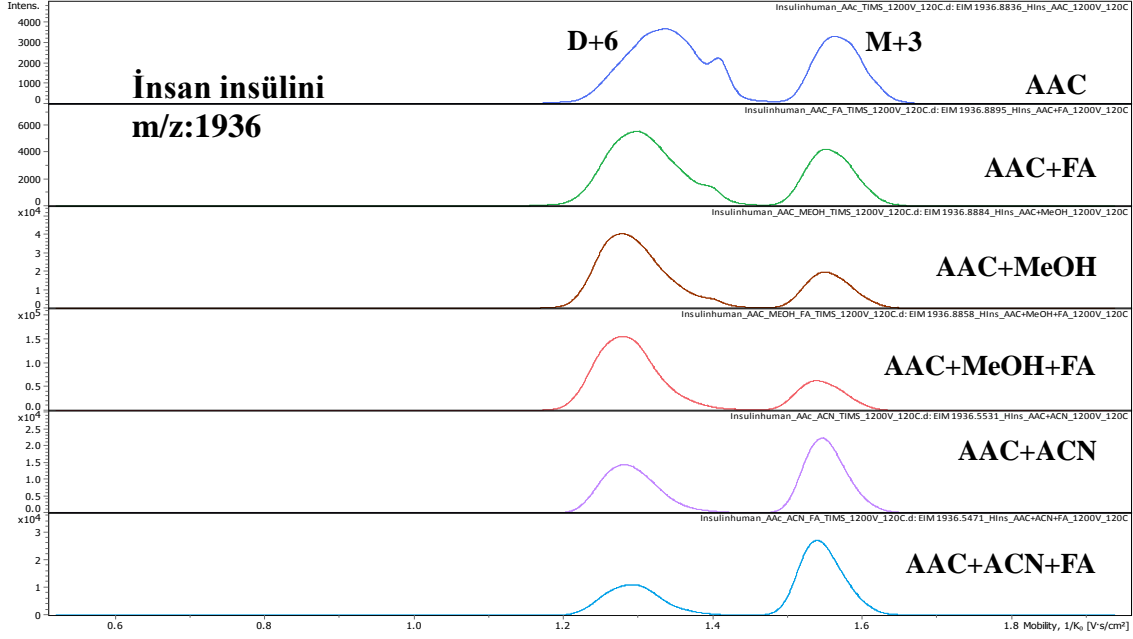
Şekil 4.2. Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7, m/z: 1660,1866) iyonuna ait mobilogramlar.



Şekil 4.3. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer iyonunun (D+7, m/z: 1660,1866) kütle spektrumu.

İnsan insülininin AAC çözeltisi içerisinde hazırlanan örneğinin TIMS-TOF-MS analizinden elde edilen mobilogramında, +7 yüklü dimer iyonuna ( $m/z:1660,1866$ ) ait sinyaller incelendiğinde, mobilogramda bu iyonun için iki farklı konformer türünün var olduğunu gösteren sinyaller gözlenmektedir (Şekil 4.2). Mobilogramlarda gözlenen sinyallerin, insan insülini yapısı için bilinmekte olan rahat (Relaxed, R) ve gergin (Tense, T) konformer iyonlarına ait olduğu düşünülmektedir [19 – 26]. Bu konformer yapılar, birebir aynı kütle/yük ( $m/z$ ) oranına sahip olduklarından dolayı analizler sonucunda elde edilen kütle spektrumlarından konformerleri ayırt edici bir bilgi alınamamaktadır. Söz konusu iyonlar için tüm çözücü türleri ile yapılan analizler sonucunda aynı kütle spektrometrik veri alınmıştır. Bunlardan sadece AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen kütle spektrumu örnek olarak verilmiştir (Şekil 4.4). +7 yüklü dimer iyonunun (D+7) yapısının, AAC çözeltisinden başlayarak, AAC+FA, AAC+ACN, AAC+ACN+FA, AAC+MeOH, AAC+MeOH+FA sırasıyla çok az da olsa açıldığı gözlenmiştir. Bu sırayla geniş konformerin kırmızı ok ile gösterilen, sağ tarafındaki bölüm biraz daha yükselirken, siyah ok ile gösterilen, sol tarafındaki çıkıntı kaybolmaktadır. Bu çözücü sırasında geniş yapıdaki iyonun bulunma bolluğu (intensity) artmaktadır (Şekil 4.2).

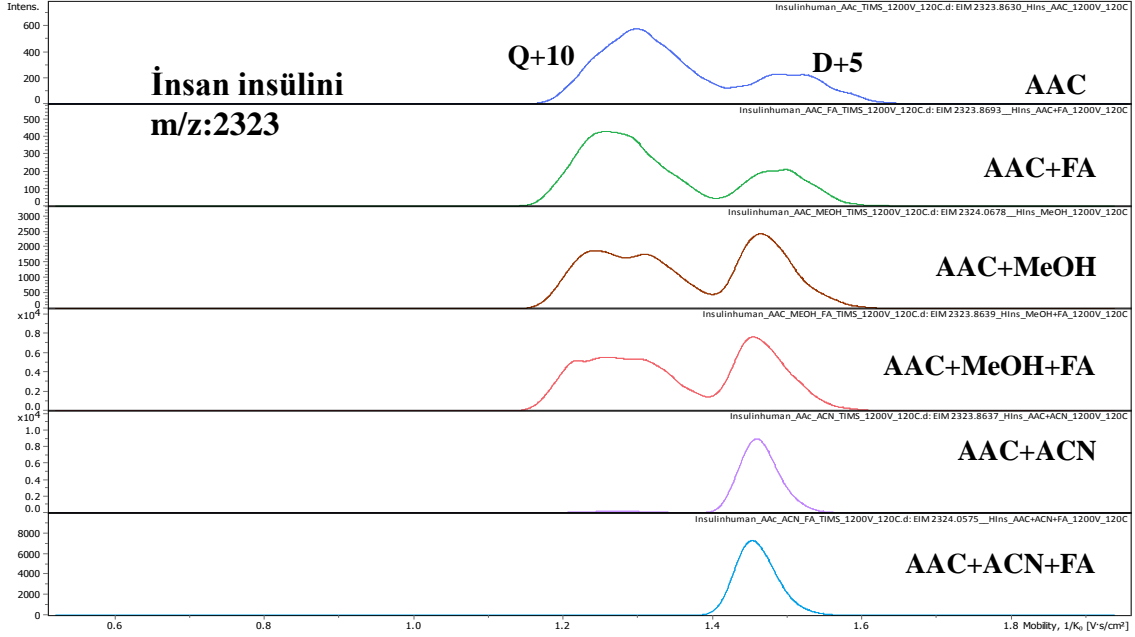
Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülini örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinde aynı kütle/yük oranına ( $m/z:1936,8836$ ) sahip +6 yüklü dimer (D+6) ve +3 yüklü monomer (M+3) iyonları gözlenmiştir (Şekil 4.4). Dimer ve monomer iyonlarının iyon mobilogramındaki sinyalleri incelendiğinde çözücü değişiminin aralarındaki oranı etkilediği gözlenmektedir. Özellikle ACN ve ACN+FA çözücülerinde hazırlanan örneklerin analizlerinde monomer iyonun için sinyalin dimere ait sinyalden daha yüksek şiddete sahip oldukları gözlenmektedir (Şekil 4.4). Sadece AAC içeren, daha yumuşak çözücü koşullarında ise ortama asit eklenmiş olsa bile, dimer ve monomer iyonuna ait sinyallerin aynı şiddet değerlerinde gözlemlendiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, AAC gibi daha yumuşak çözücü koşullarında iki adet insülin yapısının bir araya gelme olasılığının ACN çözücüsü varlığından daha yüksek olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, aynı koşullardaki analizlerde çözücü olarak MeOH içerikli çözücü kullanıldığında dimer yapılarının daha baskın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). Bu veriler, ESI işlemi sırasında MeOH içerikli çözücü kullanılmasıyla iki insülin molekülünün bir arada bulunma olasılığını arttırdığını göstermektedir.



Şekil 4.4. Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +6 yüklü dimer (D+6) ve +3 yüklü monomer (M+3) ( $m/z$ : 1936,8836) iyonlarına ait mobilogramlar.

Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülini örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinde aynı kütle/yük oranına ( $m/z$ :2323,8595) sahip +10 yüklü tetramer (Q+10) ve +5 yüklü dimer (D+5) iyonları da gözlenmiştir (Şekil 4.5). Söz konusu tetramer ve dimer iyonlarının iyon mobilogramındaki sinyalleri incelendiğinde çözücü değişiminin bu iyonlara ait sinyallerin aralarındaki oranı önemli bir şekilde etkilediği gözlenmektedir. Bu iyon grubu için AAC ve FA katkılı AAC çözücülerinde hazırlanan örneklerle elde edilen sonuçlarda tetramer oluşumunun dimer oluşumundan daha baskın olduğu gözlenmektedir. Çözücü karışımına MeOH eklenmesi ile birlikte tetramer iyonuna ait sinyalin şiddeti azalırken, dimer iyonuna ait sinyalin şiddetinin arttığı görülmüştür. ACN içerikli çözücü içerisinde hazırlanan örneklerin TIMS-TOF-MS analizleri sonucunda elde edilen iyon mobilogramında insülinin tetramer yapısına ait sinyal gözlenmemiştir. Bu iyon mobilogramında sadece +5 yüklü dimer yapısına ait sinyal gözlenebilmiştir (Şekil 4.5). Bu sonuçlara göre, beklendiği gibi, sadece AAC çözücüsü içerisinde hazırlanan örneklerde insülin birimleri arasında etkileşimlerin korunabilmesi sayesinde gaz fazında tetramer yapılarının oluşabildiği ancak MeOH ve ACN çözücülerinin varlığında etkileşimlerin bozulması sonucunda insülin birimlerinin bir araya gelmesinin zorlaştığı belirlenmiştir. Tez kapsamında MeOH içerikli çözücünün

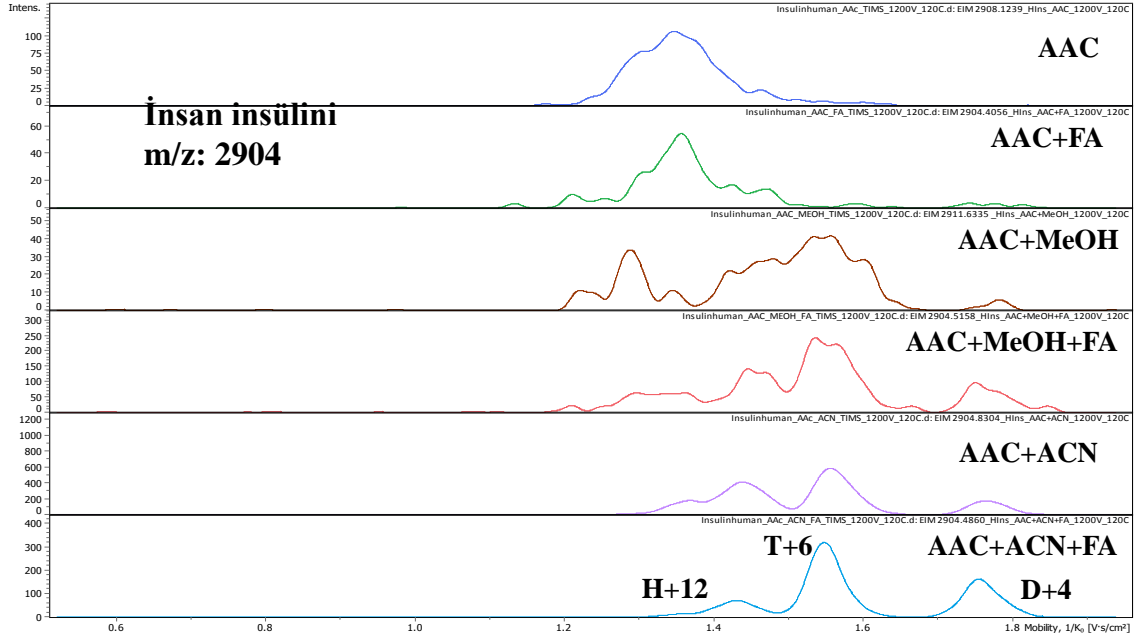
m/z:1936,8836 olan iyon grubu için dimer yapısını (D+6) koruyabildiği belirlenmiş ancak daha fazla yüke sahip ve büyük tetramer yapısının (m/z: 2323,8595, Q+10) korunmasında sadece AAC içeren çözücülerden daha az koruma etkisine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +10 yüklü tetramer (Q+10) ve +5 yüklü dimer (D+5) (m/z: 2323,8595) iyonlarına ait mobilogramlar.

Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülini örneklerinin TMS-TOF-MS analizlerinde aynı kütle/yük oranına (m/z:2904,4056) sahip +12 yüklü heksamer (H+12), +6 yüklü trimer (T+6) ve +4 yüklü dimer (D+4) iyonları da gözlenmiştir (Şekil 4.6). Söz konusu iyonların iyon mobilogramındaki sinyalleri incelendiğinde çözücü değişiminin bu iyonlara ait sinyallerin aralarındaki oranı önemli bir şekilde etkilediği gözlenmektedir. AAC içeren çözücülerde hazırlanan örnekler için sadece heksamer yapılarına ait sinyaller elde edilmişken, çözücü içeriğinde MeOH ve ACN bulunmasıyla birlikte heksamer oluşumuna karşılık gelen sinyalin şiddeti düşmüştür. Beklendiği gibi, örnek çözücüsü içeriğinde MeOH ve ACN çözücülerinin bulunması, tetramer ve dimer oluşumlarını heksamer oluşumuna göre daha baskın hale getirmiştir (Şekil 4.6).





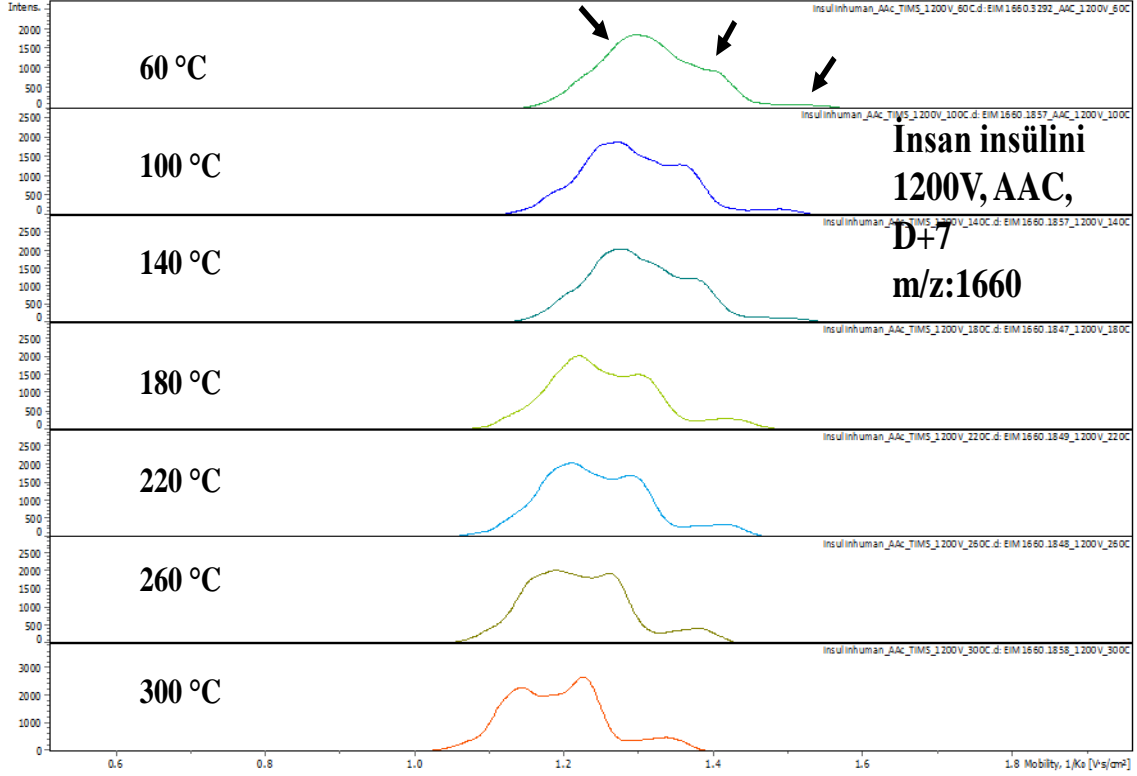
Şekil 4.6. Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +12 yüklü heksamer (H+12), +6 yüklü trimer (T+6) ve +4 yüklü dimer (D+4) (m/z: 2904,4056) iyonlarına ait mobilogramlar.

Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen verilere göre, AAC içeriği yüksek olan örneklerde insülin birimleri arasındaki etkileşimler korunabilmiştir. Çözücü içeriğinde MeOH bulunması, düşük yüke sahip küçük yapıların (örn: D+6) bir arada durmalarını sağlayabilirken, daha fazla yüke sahip büyük iyon yapılarında (Q+10), insülin birimleri arasındaki etkileşimlerin korunmasında yardımcı olamadığı gözlenmiştir. Özellikle insülin örneklerinin çözücü içeriğinde ACN bulunmasının insülin birimleri arasındaki etkileşimleri zayıflattığı belirlenmiştir.

#### 4.1.2. İnsan İnsülininin Konformasyonu Üzerinde Sıcaklık Değişimi Etkisi

İnsülin örneklerinin farklı çözücü içerikleriyle hazırlanıp TMS-TOF-MS ile analiz edilmelerinin ardından elde edilen sonuçlara göre en yumuşak çözücü koşullarının insülini sadece AAC içeren çözücüde hazırlayarak sağlandığı belirlenmiştir. Tez çalışmaları kapsamında çözücü türünün insan insülini iyonlarının konformasyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesinin ardından iyon kaynağı sıcaklığının söz konusu

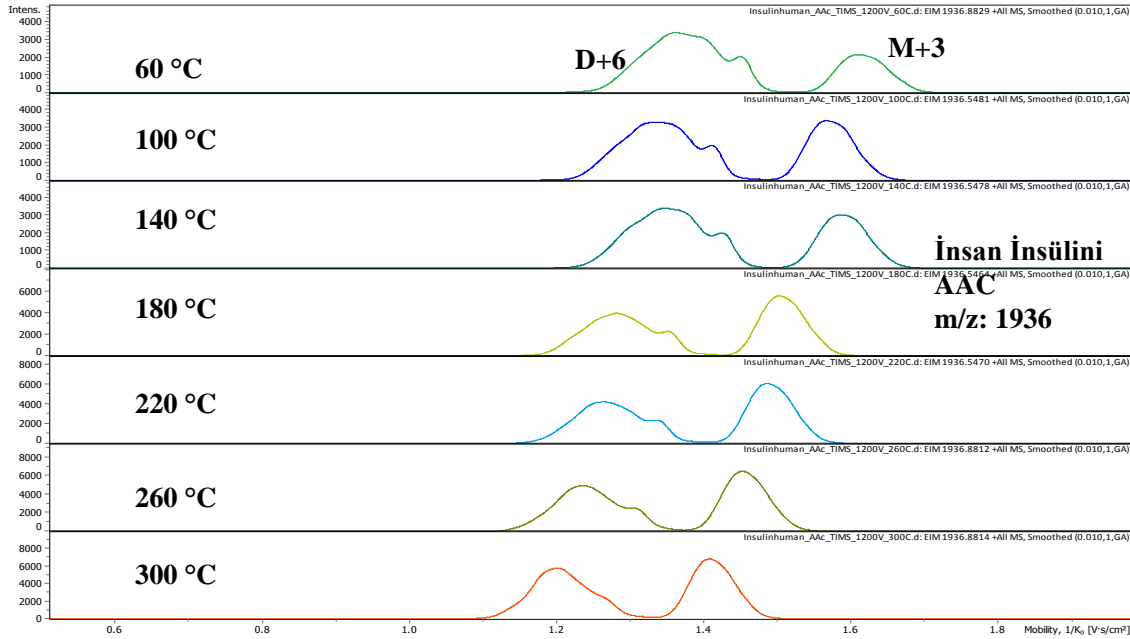
iyonların konformasyonları üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Bu analizlerde insan insülininin sadece AAC çözeltisi içerisinde çözünerek hazırlanan örnekleri kullanılmıştır.



Şekil 4.7. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7) ( $m/z$ : 1660,1857) iyonuna ait mobilogramlar.

AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülini örneği, 1200 V, sabit kapiler voltajında, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde analiz edilmiştir. TMS-TOF-MS analizlerinden +7 yüklü dimer iyonu (D+7) için elde edilen mobilogramlar incelendiğinde, sıcaklık yükseldikçe daha yüksek  $1/K_0$  değerine sahip geniş konformer iyonlarının bolluklarının arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.7). Bu veriler, sıcaklık arttıkça yapıya aktarılan enerjinin artırılmasıyla molekül içi etkileşimlerin zayıflamasına bağlı olarak geniş konformer oluşumunun daha olası hale geldiğini göstermektedir.

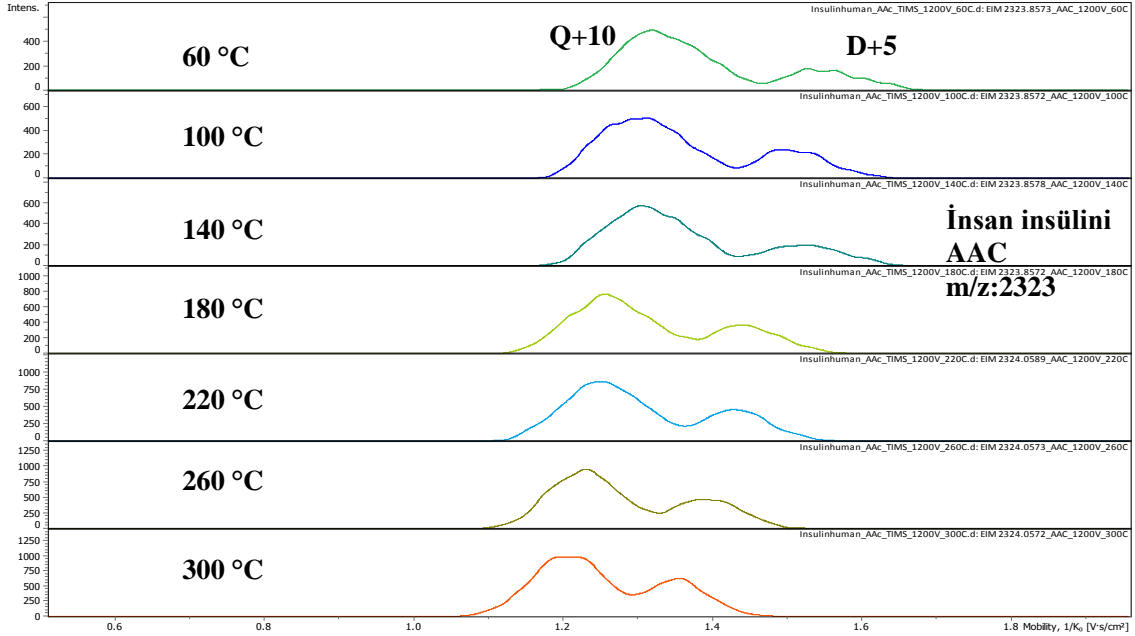
AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) ( $m/z$ : 1936,8829) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde iyon kaynağı sıcaklığının artırılması ile birlikte monomere ait sinyal değerinin, dimere ait sinyal değerine göre daha çok arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.8). Tez kapsamındaki çalışmalarda uygulanan en düşük iyon kaynağı sıcaklığı olan 60 oC’de moleküllerin ortalama kinetik enerjisinin azaltılmasının iki insülin birimi arasındaki etkileşimlerin bozulmadan dimer iyon yapılarının oluşumunu daha olası hale getirdiği görülmüştür. İyon kaynağı sıcaklığının 300 oC’ye çıkarılması durumunda moleküllerin ortalama kinetik enerjilerinin artırılması sonucunda insülin birimlerinin bir arada duramadıkları, tekli monomer iyonlarının daha baskın olduğu bir ortam meydana getirilmiştir.



Şekil 4.8. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) ( $m/z$ : 1936,8829) iyonlarına ait mobilogramlar.

İnsan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü dimer (D+5) ve +10 yüklü tetramer (Q+10)

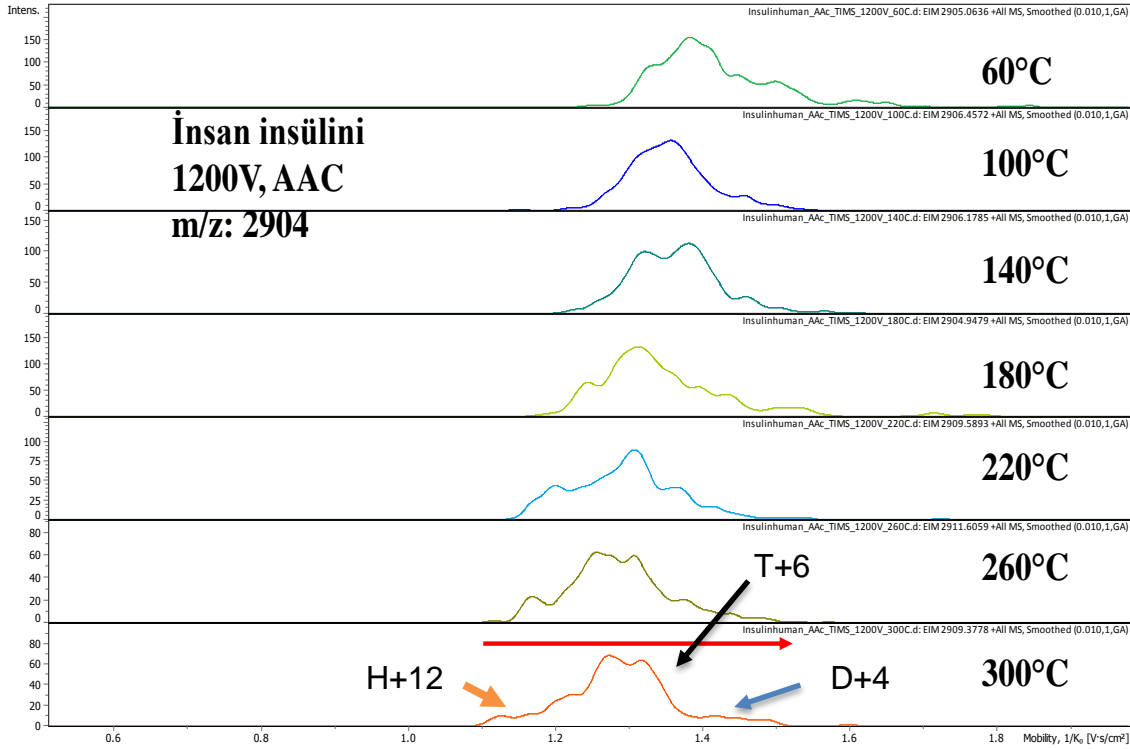
(m/z: 2323,8578) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde tez kapsamında elde edilen diğer verilerde de olduğu gibi iyon kaynağı sıcaklığının artırılmasının insülin birimlerinin bir araya gelmelerini zorlaştırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bu iyon grubu için sıcaklık değeri 60 oC'den 300 oC'ye çıkarıldıkça mobilogramlardaki tetramer oluşumuna ait sinyale karşılık dimer iyonuna ait sinyalin şiddetinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.9. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü dimer (D+5) ve +10 yüklü tetramer (Q+10) (m/z: 2323,8578) iyonlarına ait mobilogramlar.

İnsan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü heksamer (H+12) (m/z: 2904,4572) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde tez kapsamındaki çalışmalarda kullanılan en yüksek iyon kaynağı sıcaklığı olan 300 oC değerine yaklaştıkça mobilogramın 1/K<sub>0</sub> eksenindeki konformer dağılımının genişlediği gözlenmektedir (Şekil 4.10). Bu genişleme, daha küçük insülin birimlerinden meydana gelen iyon gruplarının oluştuğunu göstermektedir. Şekil 4.10 üzerinde kırmızı okla belirtilen yönde meydana gelen değişimin sıcaklık artışı ile daha küçük yapıdaki iyon gruplarının oluştuğunu ifade ettiği belirlenmiştir. Turuncu ok ile

gösterilen yapı +12 yüklü heksamer iyonuna aittir. Siyah ok ile gösterilen yapı +6 yüklü trimer iyonuna, mavi ok ile gösterilen yapı, +4 yüklü dimer iyonuna aittir. 3 farklı iyonun verdiği mobilogramda, yapının içerisinde oluşan iyon grupları kararlı değildir.



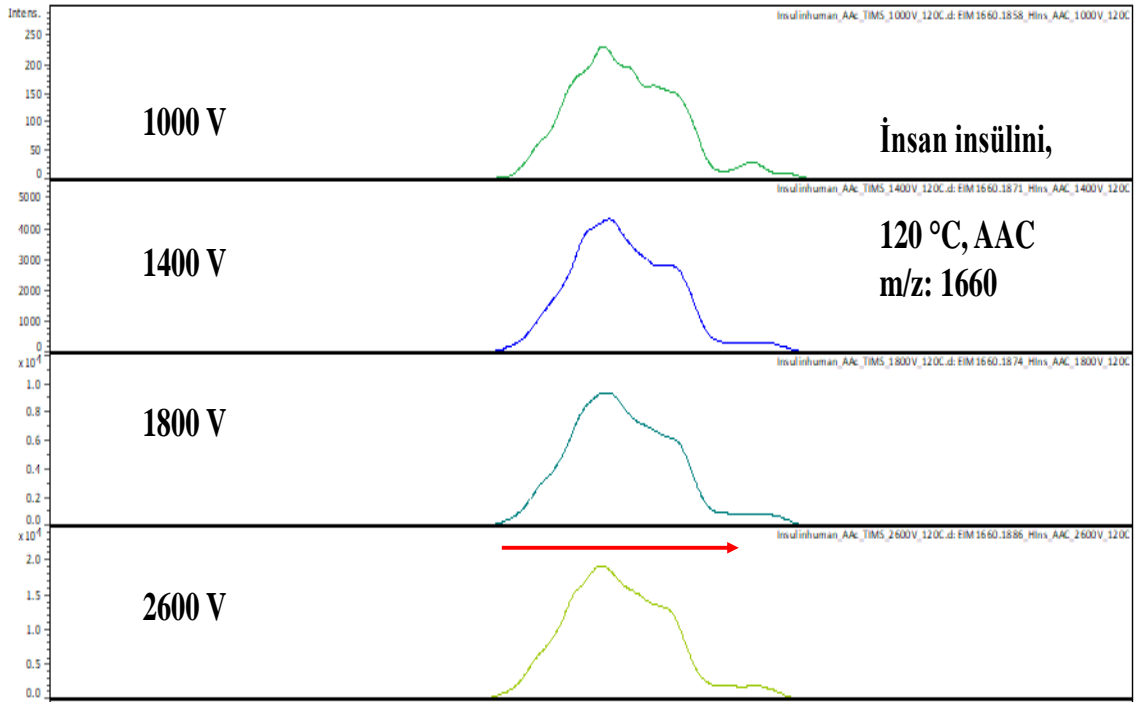
Şekil 4.10. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilen TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü heksamer (H+12) ( $m/z$ : 2904,4572) iyonlarına ait mobilogramlar.

İyon kaynağı sıcaklığının insan insülini iyonlarının konformasyonları üzerindeki etkilerinin incelendiği bu kısımda sıcaklık artışının moleküllerin ortalama kinetik enerjilerini arttırmasının bir sonucu olarak insülin birimlerinin birlikte durma olasılıklarını azalttıkları gözlenmiştir. Ancak TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen mobilogramlar değerlendirildiğinde iyon kaynağının sıcaklık değerindeki değişimlerin insülin iyonlarının konformasyonları üzerindeki etkilerinin çözücü türünün etkilerinden daha az olduğu görülmüştür.

#### 4.1.3. İnsan İnsülininin Konformasyonu Üzerinde Kapiler Voltajı Değişimi Etkisi

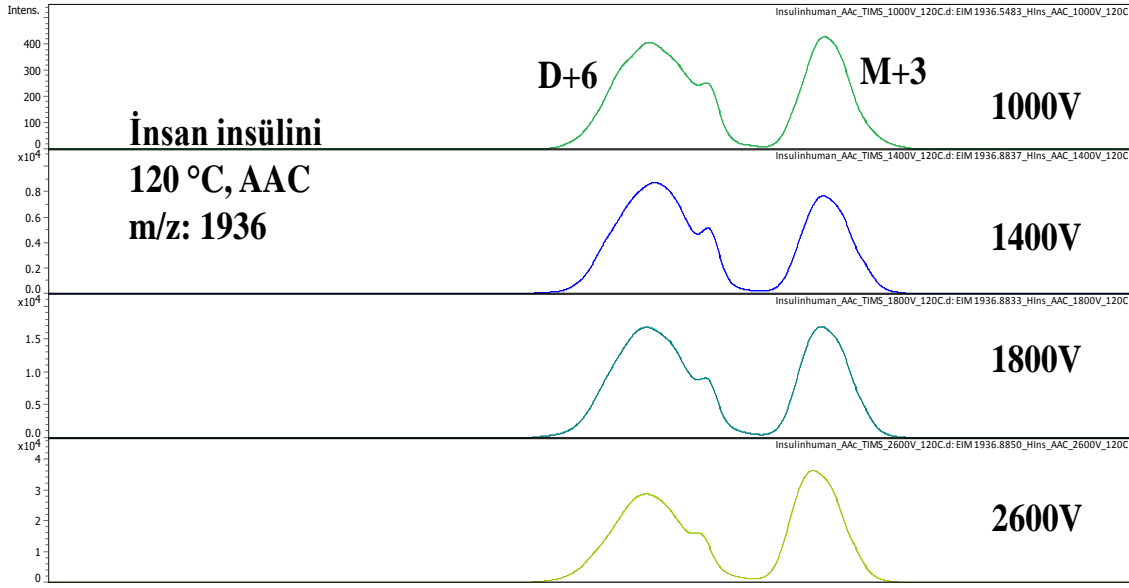
Çözücü türünün ve iyon kaynağı sıcaklığının insan insülini iyonlarının konformasyonları üzerindeki etkilerin değerlendirilmesinin ardından ESI olayı sırasında uygulanan kapiler voltajının insülin iyonlarının konformasyonu üzerindeki etkileri de tez çalışmaları kapsamında incelenmiştir. AAC çözeltilisinde hazırlanan insan insülin örneği, 120 °C sabit iyon kaynağı sıcaklığında farklı kapiler voltajı değerlerinde analiz edilmiştir.

Farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7) ( $m/z$ : 1660,1858) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde kapiler voltajının artırılmasıyla dimer iyonunun az da olsa genişlediği gözlenmektedir (Şekil 4.11). Daha geniş yapıli konformerlerin oluşumu 1/K0 ekseninin artışı yönünü işaret eden kırmızı okla gösterilmektedir. Kapiler voltajının artması sonucunda meydana gelen bu değişim yönünde pikin sol kısmındaki tepe noktasının şiddeti azalırken sağdaki omuzun şiddeti ile birlikte genişleme artmaktadır.



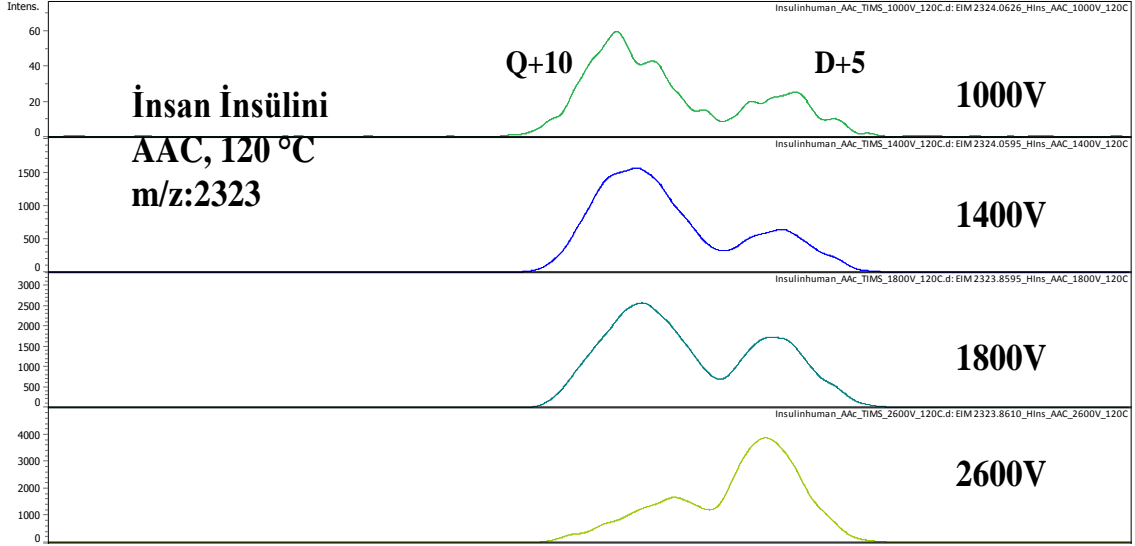
Şekil 4.11. AAC çözeltilisinde hazırlanan insan insülininin, farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7) ( $m/z$ : 1660,1858) iyonlarına ait mobilogramlar.

Farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) ( $m/z$ : 1936,5483) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde kapiler voltajının arttırılmasıyla dimer iyonuna ait sinyalin şiddetinin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.12). Bu durum, iyon sıcaklığı değişiminin konformasyon üzerindeki etkisine benzer olarak kapiler voltajı artışına bağlı olarak iyonlara aktarılan fazla enerjinin birimler arasındaki etkileşimleri zayıflatıp dimer oluşumunu azalttığını göstermektedir.



Şekil 4.12. AAC çözeltilisinde hazırlanan insan insülininin, farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) ( $m/z$ : 1936,5483) iyonlarına ait mobilogramlar.

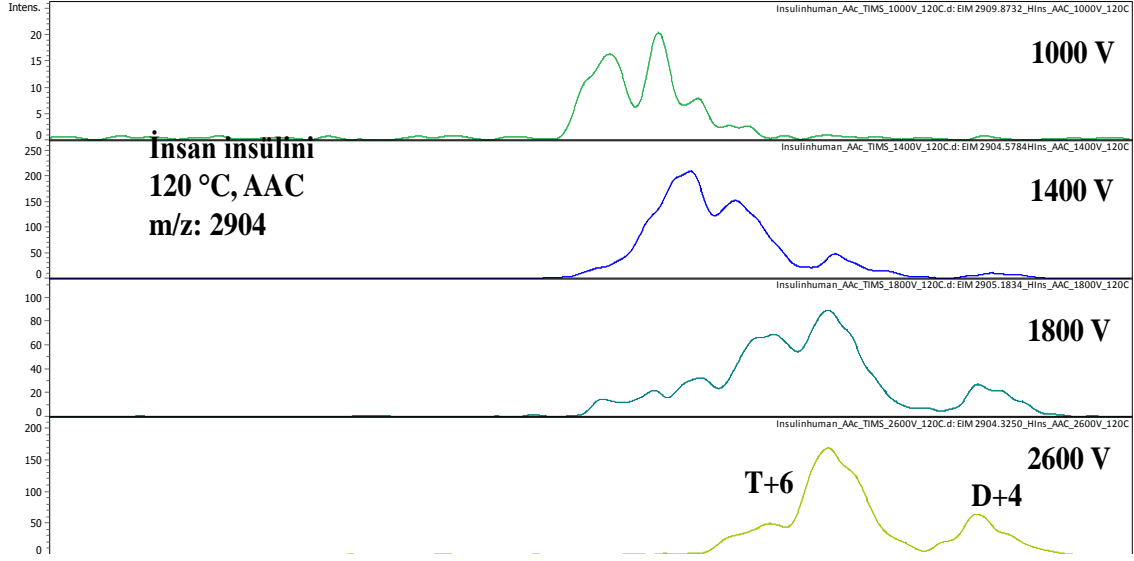
Farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +10 yüklü tetramer (Q+10) ve +5 yüklü dimer (D+5) ( $m/z$ : 2323,8595) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde kapiler voltajı değişiminin insülin iyonlarının konformasyonları üzerindeki etkileri net bir biçimde görülmektedir (Şekil 4.13). Kapiler voltajının arttırılmasıyla birlikte tetramere ait sinyal şiddetinin önemli ölçüde azaldığı ve dimer iyonuna ait sinyalin ise şiddetinin artmasına bağlı olarak daha belirgin hale geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülininin, farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +10 yüklü tetramer (Q+10) ve +5 yüklü dimer (D+5) ( $m/z$ : 2323,8595) iyonlarına ait mobilogramlar.

Farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü heksamer (H+12) ( $m/z$ : 2904,5784) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde kapiler voltajı değişiminin insülinin söz konusu iyon grubunun konformasyonu üzerinde önemli ölçüde değişikliklere neden olduğu gözlenebilmektedir (Şekil 4.14). Özellikle uygulanan en düşük kapiler voltajı değerinde (1000 V) elde edilen mobilogramda heksamer haricindeki diğer türlere ait sinyaller gözlenmemiştir. Kapiler voltajının artırılmasıyla birlikte heksamer yapısına ait sinyal şiddetinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.14).





Şekil 4.14. AAC çözeltilisinde hazırlanan insan insülininin, farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleştirilen TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü heksamer (H+12) ( $m/z$ : 2904,5784) iyonlarına ait mobilogramlar.

İnsan insülini örneklerinin TMS-TOF-MS analizlerindeki ESI işlemi sırasında uygulanan kapiler voltajı değerinin insülin iyonlarının konformasyonları üzerindeki etkileri incelendiğinde düşük yüke sahip, küçük birimlerin bu değişimden daha az etkilendikleri görülmektedir. Yapılar büyüdükçe ve taşıdıkları yük değerleri arttıkça kapiler voltajının konformasyon üzerindeki etkileri daha net bir şekilde gözlenebilmektedir. Benzer durum, çözücü türünün konformasyon üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada da görülmüştür.

İnsan insülininin TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen bu sonuçlara göre, ESI olayı sırasındaki parametrelerin yüksek yük değerlerine sahip büyük iyonların konformasyonları üzerinde meydana getirdikleri değişimlerin çok daha net bir şekilde izlenebildiği ifade edilebilmektedir.

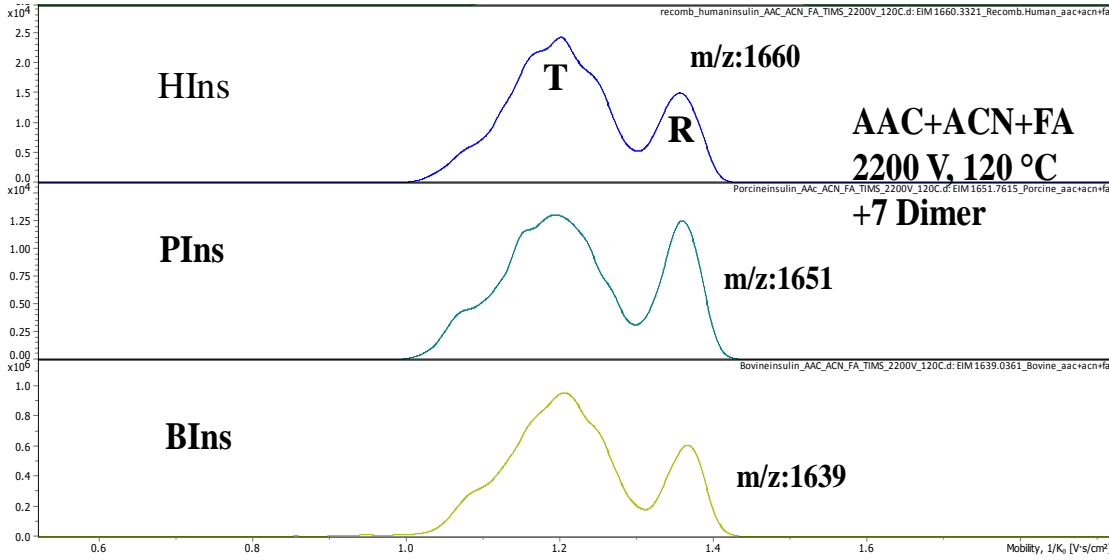
#### 4.2. İnsülin Analoglarının TMS-TOF-MS ile Analizi

İnsan insülinine (HIns) benzer olarak sığırsülini (BIns) ve domuz insülini (PIns) analizleri de TMS-TOF-MS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Domuz insülini, yapısında insan insülininkinden bir adet farklı amino asit içerirken, sığırsülini, insan

insülininden üç adet farklı amino asit içermektedir. Tez çalışmalarının bu kısmında bu üç farklı insülin türü, TIMS-TOF-MS tekniği ile aynı koşullar altında analiz edilmiştir. Bu analizlerden proteinlerin konformasyonel özellikleri ile ilgili veriler elde edilerek amino asit dizilimine bağlı olarak türlerin gaz fazında oluşturdukları birimlerin (monomer, dimer, trimer, tetramer, heksamer) değişimi incelenmiştir. Çalışmanın bu kısmında tüm örnekler, çözünürlük parametresinin iyonlaşma verimi üzerindeki etkisini elimine etmek amacıyla, çalışılan insülin türlerinin içerisinde benzer çözünürlüğe sahip oldukları 10 mM amonyum asetat : asetonitril (1:1, % 0.1 formik asit (v/v)) karışımında hazırlanmıştır. TIMS-TOF-MS analizlerinde tüm türler için yüksek oranda iyonlaşma veriminin sağlanabildiği sabit 2200 V kapiler voltajı ve 120 °C iyon sıcaklığı değerleri kullanılmıştır. Bu sayede, ESI işlemi sırasında kapiler voltajı ve iyon kaynağı sıcaklığının iyonların konformasyonları üzerindeki etkileri göz ardı edilerek farklı insülin türlerine ait birimlerin yapısal özellikleri kıyaslanabilmektedir.

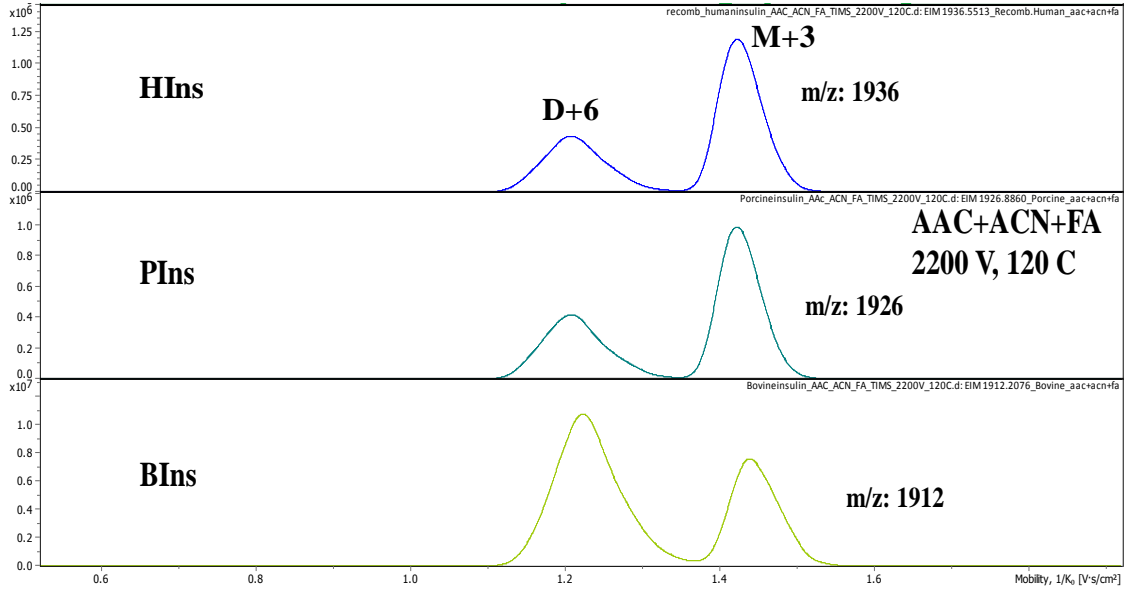
İnsülin türlerinin monomer iyonlarının analizlerinden benzer verilerin elde edilmesi ve veriler arasında anlamlı farklılıkların tespit edilememesinden dolayı, söz konusu analogların konformasyonel özellikleri, daha büyük yapıya ve yüksek yük değerlerine sahip iyonlara ait sonuçlar değerlendirilerek incelenmiştir.

HIns, PIns ve BIns örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde üç farklı tür için de aynı koşullar altında kompakt (T, tense) ve geniş (R, relaxed) konformerlere ait sinyaller ayırt edilebilmektedir (Şekil 4.15). Bu konformerlere ait sinyallerin şiddetlerinin birbirlerine oranlarının üç farklı insülin türü için de benzer değerlerde olduğu görülmüştür. Buna göre, HIns, PIns ve BIns türlerinin aralarındaki amino asit farklılıklarının +7 yüklü dimer iyonlarının sahip olduğu konformasyonlar üzerinde etkili olmadıkları ifade edilebilir.



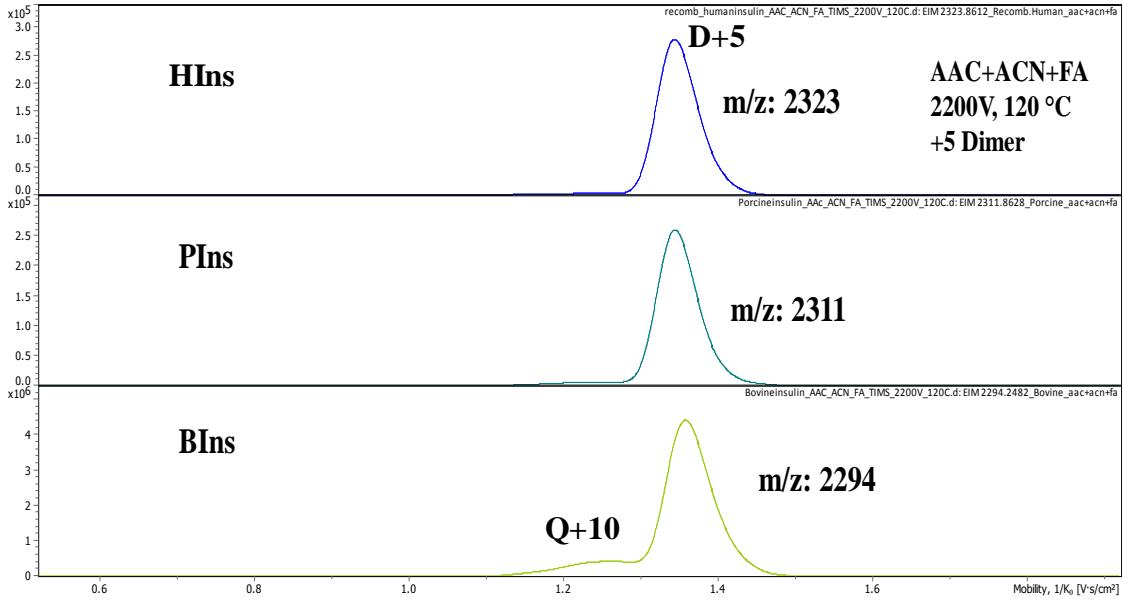
Şekil 4.15. AAC+ACN+FA (1:1 (10 mM AAC:ACN) % 0.1 FA (v/v)) çözücüsünde hazırlanan HIns, PIns ve BIns örneklerinin 2200 V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında gerçekleştirilen TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7) iyonlarına ait mobilogramlar.

HIns, PIns ve BIns örneklerinin TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde ise türlerin konformasyonel özellikleri hakkında anlamlı farklılar belirlenebilmiştir (Şekil 4.16). Üç farklı insülin türü için de belirli yük değerlerine sahip monomer ve dimer oluşumu gözlenmiştir. Ancak, BIns örneğine ait mobilogramda dimer oluşumuna karşılık gelen sinyalin monomer iyonuna karşılık gelen sinyalden daha yüksek şiddette olduğu görülmüştür. Yapılarında sadece bir amino asit farklılık olan HIns ve PIns örnekleri içinse, monomer ve dimer iyonlarına karşılık gelen sinyallerin şiddetleri benzer orana sahiptir. Bu türler için +3 yüke sahip monomer iyonlarının bulunma olasılığının +6 yüke sahip dimer oluşturma olasılıklarından yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu verilere göre, amino asit dizilimlerinde sadece bir amino asit biriminin farklı olduğu HIns ve PIns yapılarının gaz fazında benzer konformer oranına sahip oldukları ve kendilerine göre amino asit diziliminde üç birim farklılık gösteren BIns yapısından konformasyonel olarak net bir biçimde ayırt edilebildikleri ifade edilebilir. Bu koşullar altında BIns birimlerinin dimer iyonu oluşturma eğiliminin HIns ve PIns birimlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.



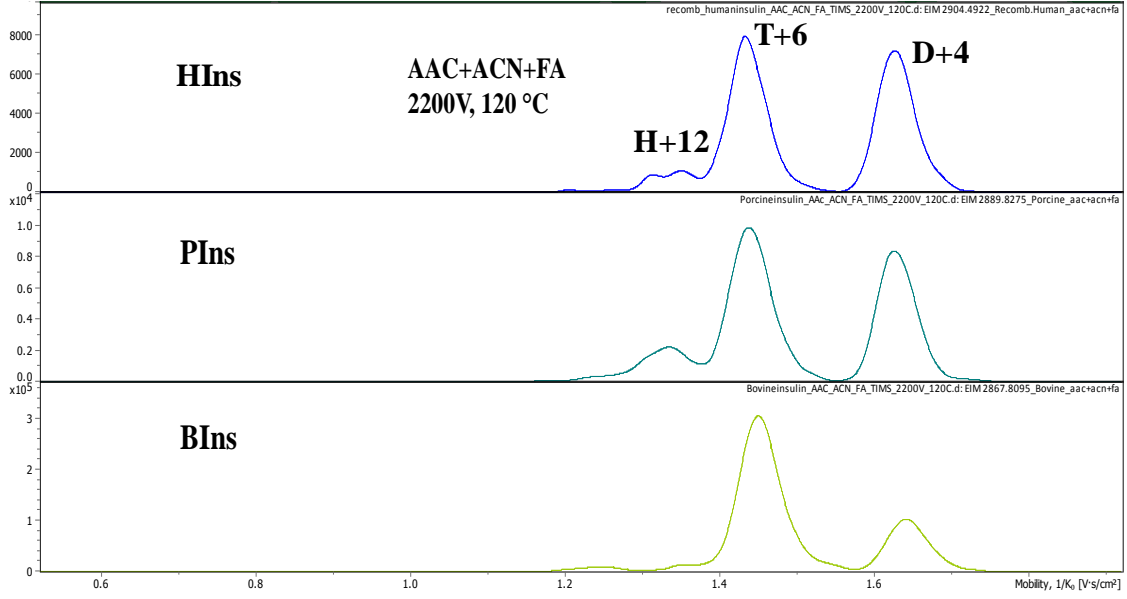
Şekil 4.16. AAC+ACN+FA (1:1 (10 mM AAC:ACN) % 0.1 FA (v/v)) çözücüsünde hazırlanan HIns, PIns ve BIns örneklerinin 2200 V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) iyonlarına ait mobilogramlar.

HIns, PIns ve BIns örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü dimer (D+5) ve +10 yüklü tetramer (Q+10) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde, +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) iyonları için alınan verilerden elde edilen sonuçlara benzer çıkarımlar yapılabilmektedir (Şekil 4.17). Bu iyon grubu için elde edilen tüm mobilogramlarda +5 yüklü dimer iyonuna ait yüksek şiddetli sinyal gözlenmiştir. Şekil 4.17’de verilen mobilogramlar içerisinde sadece BIns türüne ait mobilogramda +10 yüklü tetramer yapısına ait sinyal, düşük şiddetli de olsa belirgin bir şekilde görülebilmektedir. Bu iyon grubu için de amino asit dizilimleri yüksek oranda birbirine benzeyen HIns ve PIns türlerinin benzer mobilogramlara sahip oldukları gözlenmektedir. Bu koşullar altında BIns birimlerinin tetramer oluşturma eğiliminin HIns ve PIns birimlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 4.17. AAC+ACN+FA (1:1 (10 mM AAC:ACN) % 0.1 FA (v/v)) çözücüsünde hazırlanan HIns, PIns ve BIns örneklerinin 2200 V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü dimer (D+5) ve +10 yüklü tetramer (Q+10) iyonlarına ait mobilogramlar.

HIns, PIns ve BIns örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü hegzamer (H+12) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde de HIns ve PIns türleri için benzer ve BIns türünden farklı verilerin elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.18). +4 yüklü dimer oluşumuna karşılık gelen sinyalin BIns örneğinin analizinden alınan mobilogramda en düşük şiddete sahip olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, altı adet insülin biriminin bir araya gelerek oluşturduğu +12 yüklü hegzamer yapısına ait sinyal, amino asit dizilimleri benzer olan HIns ve PIns türlerinin analizlerinden elde edilen mobilogramlarda gözlenebilmiştir. Hegzamer yapısına karşılık gelen sinyalin BIns türü için elde edilen mobilogramda oldukça düşük şiddet değerlerinde elde edildiği belirlenmiştir. Bu veriler, BIns birimlerinin bir araya gelerek hegzamer yapıyı oluşturma olasılığının HIns ve PIns türlerine göre daha düşük olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.18. AAC+ACN+FA (1:1 (10 mM AAC:ACN) % 0.1 FA (v/v)) çözücüsünde hazırlanan HIns, PIns ve BIns örneklerinin 2200 V kapiler voltajı, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında gerçekleştirilen TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü heksamer (H+12) iyonlarına ait mobilogramlar.

Aynı şekilde hazırlanan ve aynı koşullar altında analiz edilen üç farklı insülin türünün TMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen veriler değerlendirildiğinde, insülin proteinlerinin amino asit dizilimlerinin gaz fazında farklı sayıda birim içeren yapılarının oluşumları üzerinde belirleyici oldukları gözlemlenmiştir. Bu sayede, iyon hareketliliği-kütle spektrometrisi analizleri ile proteinlerin amino asit dizilimindeki birimlerin benzerliklerine bağlı olarak konformasyonel olarak farklılandırılacakları görülmüştür.

## 5. SONUÇLAR

- Amonyum asetat (AAC), asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) ve bu çözücülerin % 0.1 formik asit (FA) eklenmiş insan insülini (HIns) örneklerinin, TIMS – TOF – MS cihazında, 1200 V kapiler voltajı ve 120 ° C iyon kaynağı sıcaklığında yapılan analizlerinde, monomer iyonlarının (+5 yüklü monomer, +4 yüklü monomer v.b.) konformasyonlarının çözücü değişimlerinden etkilenmediği gözlenmiştir.

- Amonyum asetat (AAC), asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) ve bu çözücülerin % 0.1 formik asit (FA) eklenmiş insan insülini (HIns) örneklerinin, TIMS – TOF – MS cihazında, 1200 V kapiler voltajı ve 120 ° C iyon kaynağı sıcaklığında yapılan analizlerinde, +7 yüklü dimer iyonunun (m/z:1660,1866) yapısında, iki farklı konformeri olduğu gözlenmiştir [19 – 26]. Sadece kütle spektrometrisi ile yapılan analizlerde, gözlenemeyecek olan konformer farklılığı, iyon hareketliliği kütle spektrometrisi (IMS – MS) ile gözlenmiştir. IMS – MS, mobilogramlarındaki farklılığı, etkin çarpıma kesitlerindeki farklılıktan yararlanarak ortaya çıkarmaktadır [93]. Mobilogramlarında gözlenen iki farklı konformerin, rahat (Relaxed, R) ve gergin (Tense, T) konformer iyonlarına ait olduğu belirtilmiştir. Çözücü değişimi +7 yüklü dimer iyonun yapısını az da olsa açtığı gözlenmiştir. MeOH ile hazırlanan örneğin, daha yumuşak koşulda, AAC ile hazırlandığındaki konformasyonundan çok az da olsa farklı olduğu, biraz daha açıldığı gözlenmiştir. MeOH çözücüsü, insülin yapısının biraz daha açılmasına ve bulunma bolluğunun artmasına neden olmuştur.

- Amonyum asetat (AAC), asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) ve bu çözücülerin % 0.1 formik asit (FA) eklenmiş insan insülini (HIns) örneklerinin, TIMS – TOF – MS cihazında, 1200 V kapiler voltajı ve 120 ° C iyon kaynağı sıcaklığında yapılan analizlerinde, aynı kütle/yük oranına (m/z:1936,5483) sahip +6 yüklü dimer (D+6) ve +3 yüklü monomer (M+3) iyonlarının yapılarının çözücü değişimi ile aralarındaki oranın etkilendiği gözlenmiştir. ACN ve ACN+FA çözücülerini ile hazırlanan örneklerde, +3 yüklü monomer iyonunun +6 yüklü dimer iyonuna göre daha yüksek şiddete sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum, ACN çözücüsünün, monomer iyonlarının bir araya gelerek dimer iyonunu oluşturma olasılığını azaltmasından kaynaklanmaktadır. AAC ve AAC+FA çözücülerinde, bu iki farklı iyonun ait sinyallerin

eşit olduğu gözlenmiştir. Bu durum, daha yumuşak koşul olan AAC ve AAC+FA çözücülerinde, monomer ve dimer iyonlarının bir araya gelme olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Diğer çözücü, MeOH ve MeOH+FA çözücülerinde, +6 yüklü dimer yapısının daha baskın olduğu gözlenmiştir. Bu veriler, ESI olayı sırasında MeOH içerikli çözücü kullanılmasının iki insülin molekülünün bir arada bulunma olasılığını arttırdığını göstermektedir.

- Amonyum asetat (AAC), asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) ve bu çözücülerin % 0.1 formik asit (FA) eklenmiş insan insülini (HIns) örneklerinin, TIMS – TOF – MS cihazında, 1200 V kapiler voltajı ve 120 ° C iyon kaynağı sıcaklığında yapılan analizlerinde, aynı kütle/yük oranına (m/z:2323,8595) sahip +10 yüklü tetramer (Q+10) ve +5 yüklü dimer (D+5) iyonlarının iyon mobilogramındaki sinyalleri incelendiğinde çözücü değişiminin bu iyonlara ait sinyallerin aralarındaki oranı önemli bir şekilde etkilediği gözlenmektedir. Daha yumuşak koşul olan AAC çözücüsünde, tetramer yapısını oluşturma eğilimi daha yüksek olduğu için sinyal şiddeti daha yüksektir. Ancak, ACN ve MeOH çözücülerinde, insülin birimleri arasında etkileşimin bozulmasından kaynaklı olarak bir araya gelme olasılığı azalmıştır. Bu durum, tetramer iyonunun oluşma olasılığını azaltmaktadır.

- Amonyum asetat (AAC), asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) ve bu çözücülerin % 0.1 formik asit (FA) eklenmiş insan insülini (HIns) örneklerinin, TIMS – TOF – MS cihazında, 1200 V kapiler voltajı ve 120 ° C iyon kaynağı sıcaklığında yapılan analizlerinde, aynı kütle/yük oranına (m/z:2904,4056) sahip +12 yüklü heksamer (H+12), +6 yüklü trimer (T+6) ve +4 yüklü dimer (D+4) iyonlarının mobilogramları incelendiğinde, çözücü değişiminin önemli şekilde etkilediği gözlenmiştir. Özellikle ACN ile hazırlanan insülin örneğinde, iyonlar arası etkileşim azaldığından dolayı, daha büyük yapı oluşturma eğilimleri azalmış ve iyonların bulunma bolluğu azalmıştır.

- Farklı çözücülerde hazırlanan insan insülininin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen verilere göre, AAC içeriği yüksek olan örneklerde insülin birimleri arasındaki etkileşimler korunabilmiştir. Çözücü içeriğinde MeOH bulunması, düşük



yüke sahip küçük yapıların (örn: D+6) bir arada durmalarını sağlayabilirken, daha fazla yüke sahip büyük iyon yapılarında insülin birimleri aralarındaki etkileşimlerin korunmasında yardımcı olamadığı gözlenmiştir. Özellikle insülin örneklerinin çözücü içeriğinde ACN bulunmasının insülin birimleri arasındaki etkileşimleri zayıflattığı belirlenmiştir.

- AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülini örneği, TIMS-TOF-MS analizlerinden +7 yüklü dimer iyonu (D+7) için, 1200 V kapiler voltajı analizinde, sıcaklık yükseldikçe daha yüksek 1/K0 değerine sahip geniş konformer iyonlarının bolluklarının arttığı gözlenmiştir. Bu durum, sıcaklık arttıkça yapıya aktarılan enerjinin artırılmasıyla molekül içi etkileşimlerin zayıflamasına bağlı olarak geniş konformer oluşumunun daha olası hale geldiğini göstermektedir.

- AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülini örneği, TIMS-TOF-MS analizlerinden +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) (m/z: 1936,8829) iyonları için, 1200 V kapiler voltajı analizinde, sıcaklığının artırılması ile birlikte monomere ait sinyal değerinin, dimere ait sinyal değerine göre daha çok arttığı gözlenmiştir. Düşük sıcaklıkta, moleküllerin arasındaki etkileşim bozulmadığından dolayı, +3 yüklü monomer iyonunun biraraya gelerek +6 yüklü dimer iyonu oluşturma eğilimi daha fazladır. Sıcaklık yükseldikçe, artan kinetik enerjiden dolayı, monomerlerin dimer oluşturma eğilimleri azalmaktadır. Bu durum, +5 yüklü dimer (D+5) ve +10 yüklü tetramer (Q+10) (m/z: 2323,8578) iyonları için de geçerlidir.

- AAC çözeltisinde hazırlanan insan insülini örneği, TIMS-TOF-MS analizlerinden +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü heksamer (H+12) (m/z: 2904,4572) iyonları için 1200 V kapiler voltajı analizinde, diğer iyonlar gibi artan sıcaklık ile birlikte kinetik enerjileri artmıştır. Bu artıştan dolayı, iyonların birarada durma eğilimleri azalmıştır.

- İyon kaynağı sıcaklığı değişimi, insülin örneklerinin konformasyonları üzerinde çözücü değişiminden daha az etkilidir. Çözücü değişimi, insülin örnekleri üzerinde daha etkili olmuştur.
- AAC çözeltilinde hazırlanan insan insülini örneği, TIMS-TOF-MS analizlerinden +7 yüklü dimer iyonu (D+7) için, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında, kapiler voltajın 1000 V'dan başlayarak 3000 V'a kadar artırılması ile genişlediği gözlenmiştir. İyonun oluşturduğu iki konformerden, kapiler voltaj arttırıldıkça, bulunma bolluğu da artmaktadır. Artan voltaj ile birlikte iyonlaşan molekül sayısı daha fazla olmaktadır.
- AAC çözeltilinde hazırlanan insan insülini örneği, TIMS-TOF-MS analizlerinden, +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) (m/z: 1936,5483) iyonları için, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında, kapiler voltajın 1000 V'dan başlayarak 3000 V'a kadar artırılması ile, dimer iyonuna ait sinyal şiddetinin azaldığı ve monomer iyonuna ait sinyal şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Artan kapiler voltaj ile molekül içerisinde etkileşimler zayıflayarak, dimer oluşturma eğilimi azalmaktadır.
- AAC çözeltilinde hazırlanan insan insülini örneği, TIMS-TOF-MS analizlerinden, +10 yüklü tetramer (Q+10) ve +5 yüklü dimer (D+5) (m/z: 2323,8578) iyonları için, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında, kapiler voltajın 1000 V'dan başlayarak 3000 V'a kadar artırılması ile, tetramer iyonuna ait sinyal şiddetinin azaldığı ve dimer iyonuna ait sinyal şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Artan kapiler voltaj ile molekül içerisinde etkileşimler zayıflayarak, tetramer oluşturma eğilimi azalmaktadır.
- AAC çözeltilinde hazırlanan insan insülini örneği, TIMS-TOF-MS analizlerinden, +4 yüklü dimer (D+4), +6 yüklü trimer (T+6) ve +12 yüklü heksamer (H+12) (m/z: 2904,5784) iyonları için, 120 °C iyon kaynağı sıcaklığında, kapiler voltajın 1000 V'dan başlayarak 3000 V'a kadar artırılması ile, yapılar arası zayıflayan etkileşimler yüzünden, düşük voltajda gözlenen heksamer iyonu, voltaj yükseldiğinde gözlenmemiştir.

- Kapiler voltajı değişimi, insülin örneklerinin konformasyonları üzerinde çözücü değişiminden daha az etkilidir. Çözücü değişimi, insülin örnekleri üzerinde daha etkili olmuştur.
- İnsan insülini (HIns), domuz insülini (PIns) ve sığır insülini (BIns) örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinde, moleküler ağırlıkları farklı olduğu için hepsinin farklı m/z oranları olacağı bilinmektedir [94,95]. Bu farklılıktan yararlanarak ayırım yapılabilmektedir. Ancak, oluşan oligomerik yapıların karşılaştırılması amacıyla bu çalışmalar yapılmıştır. Aynı şartlar altında, yapılarındaki amino asit farklılıklarının etkisi incelenmiştir.
- İnsan insülini (HIns), domuz insülini (PIns) ve sığır insülini (BIns) örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer (D+7) iyonları karşılaştırıldığında, iki farklı konformerin oluşturduğu sinyaller benzerdir. Bu insülinler arasında amino asit farklılıkları, +7 yüklü dimer iyonu için etkili değildir.
- HIns, PIns ve BIns örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer (M+3) ve +6 yüklü dimer (D+6) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde ise türlerin konformasyonel özellikleri hakkında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Aralarında sadece bir amino asit farklı olan insan ve domuz insülinlerinde +3 yüklü monomer iyonu, +6 yüklü dimer iyonuna oranla daha fazla bulunma bolluğuna sahiptir. İnsan insülinine göre üç farklı amino asit içeren sığır insülininde ise +6 yüklü dimer iyonunun bulunma bolluğu +3 yüklü monomer iyonuna göre daha fazladır. BIns birimlerinin dimer iyonu oluşturma eğilimi, HIns ve PIns birimlerinden daha yüksektir.
- HIns, PIns ve BIns örneklerinin TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen +5 yüklü dimer (D+5) ve +10 yüklü tetramer (Q+10) iyonlarına ait mobilogramlar incelendiğinde ise +3 yüklü monomer ve +6 yüklü dimer iyonları ile aynı şekilde olduğu gözlenmiştir.

- Aynı şekilde hazırlanan ve aynı koşullar altında analiz edilen üç farklı insülin türünün TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen veriler değerlendirildiğinde, insülin proteinlerinin amino asit dizilimlerinin gaz fazında farklı sayıda birim içeren yapılarının oluşumları üzerinde belirleyici oldukları belirlenmiştir. Bu sayede, iyon hareketliliği-kütle spektrometrisi analizleri ile proteinlerin amino asit dizilimlerindeki birimlerin benzerliklerine bağlı olarak konformasyonel olarak farklılandırılacakları görülmüştür.

- Tez kapsamında tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometrisi- uçuş zamanlı-kütle spektrometrisi (TIMS-TOF-MS) sistemi kullanılarak örnek çözücüsünün bileşimi, iyon kaynağı sıcaklığı ve kapiler voltajı gibi parametrelerin insülin proteininin konformasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu parametrelerin insülin gibi oligomerik yapılar oluşturabilen proteinlerin kütle spektrometrik analizleri sonucunda elde edilen verileri nasıl etkiledikleri değerlendirilmiştir. Amonyum asetat içeriği yüksek çözücü karışımlarında hazırlanan örneklerin analizinden elde edilen verilerin insülin proteininin doğala yakın oligomerik yapılarının analizi için uygun olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, düşük iyon kaynağı sıcaklığı ve kapiler voltajı kullanılarak daha yumuşak kütle spektrometrik analiz koşullarının sağlanabileceği görülmüştür. Tez çalışmaları kapsamında elde edilen bu bilgiler kullanılarak insülin proteininin doğala yakın konformasyonuna sahip olarak analiz edilebileceği parametrelerin belirlenmesi mümkün olabilecektir.

- İnsülin analoglarının aynı koşullar altında gerçekleştirilen TIMS-TOF-MS analizlerinden elde edilen sonuçlara göre, proteinlerin sahip oldukları amino asit dizilimlerinin konformasyonları üzerinde belirleyici olduğu tespit edilmiştir. Dizilimlerinde bir adet amino asit farklılığı bulunduran insan ve domuz insülinlerinin konformasyonel özellikleri benzer iken, kendilerine göre dizilimlerinde üç adet amino asit farklılık bulunduran sığır insülininin farklı konformasyonel özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen bilgilere göre proteinlerin amino asit dizilimi-konformasyon ilişkisinin değerlendirilmesiyle farklı protein gruplarının analitik olarak farklılandırılacakları görülmüştür.

- İnsülin hormonunun konformasyonu hakkında detaylı bilgi sahibi olduğumuz bu çalışma, bu hormon ile yapılacak bütün çalışmalara öncülük edecektir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Nelson, D. L., Cox, M.M. in Lehninger Principles of Biochemistry, Freeman, W.H. and Company (4th Ed.), pp. 902-906, New York, Chapter 23, **2005**.
2. Newsholme, E. A., & Dimitriadis, G., Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism., 109(SUPPL. 2), 122–134, **2001**.
3. Baykut, G., Akhter Hossain, M., W. Tregear, G., & D. Wade, J., The Chemical Synthesis of Insulin: From the Past to the Present. Immunology, Endocrine & Metabolic Agents - Medicinal Chemistry, 11(1), 8, **2011**.
4. IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation, Brussels, **2011**.
5. Banting, F.G.; Best, B.A. The internal secretion of the pancreas. J. Lab. Clin. Med., 7(5), 251-266, **1922**.
6. Ryle, A.P.; Sanger, F.; Smith, L.F.; Kitai, R. The disulphide bonds of insulin. Biochem. J., 60(4), 541-556, **1955**.
7. Sanger, F.; Smith, L.F.; Kitai, R. The disulphide bridges of insulin. Biochem. J., 58(1), vi-vii, **1954**.
8. Brange, J., Langkjær, L. In: Insulin structure and stability, Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs. Springer, pp. 315–350, **1993**.
9. du Vigneaud, V. Trail of sulfur research: from insulin to oxytocin. Science, 123 (3205), 967-974, **1956**.

10. Guo, Z. Y., & Feng, Y. M. Effects of cysteine to serine substitutions in the two inter-chain disulfide bonds of insulin. *Biological Chemistry*, 382(3), 443–448, **2001**.
11. Seo, E. S., & Sherman, J. C. Emily S. Seo, John C. Sherman, 88(5), 774–779, **2007**.
12. Anonim, Insulin Synthesis and Secretion, <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin.html> (Erişim tarihi: Nisan **2019**).
13. Bhargava, R., Mitsides, N., Saif, I., Macdowall, P., & Woywodt, A. C-peptide and combined kidney-pancreas transplantation, (September), 489–492, **2009**.
14. Akbarian, M., Ghasemi, Y., Uversky, V. N., & Youse, R. Chemical modifications of insulin: Finding a compromise between stability and pharmaceutical performance, 547(April), 450–468, **2018**.
15. Lilly, E. Chemical, Physical, and Biologic Properties of Biosynthetic Human Insulin, 4(2), 147–154, **1981**.
16. Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D., Mercola, D. (1972). *Advances in Protein Chemistry*, (Ed: C. B. Anfinsen). Academic Press, London, pp. 279–402, **1972**.
17. O'Donoghue, S. I., Chang, X., Abseher, R., Nilges, M., Led, J. J. Unraveling the symmetry ambiguity in a hexamer: calculation of the R6 human insulin structure. *J. Biomol. NMR*, 16, 93, **2000**.

18. Smith, G. D., Pangborn, W. A., Blessing, R. H., The structure of T6 human insulin at 1.0 Å resolution. *Acta Crystallogr. D*, 59, 474, **2003**.
19. Salbo, R., Bush, M. F., Naver, H., Campuzano, I., Robinson, C. V., Pettersson, I., Haselmann, K. F., Traveling-wave ion mobility mass spectrometry of protein complexes: Accurate calibrated collision cross-sections of human insulin oligomers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(10), 1181–1193, **2012**.
20. Palmieri, L. C., Fávero-Retto, M. P., Lourenço, D., & Lima, L. M. T. R., A T3R3 hexamer of the human insulin variant B28Asp. *Biophysical Chemistry*, 173–174, 1–7, **2013**.
21. Bhatnagar, S., Srivastava, D., Jayadev, M. S. K., & Dubey, A. K., Molecular variants and derivatives of insulin for improved glycemic control in diabetes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 91(3), 199–228, **2006**.
22. Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D., Mercola, D., in *Advances in Protein Chemistry*, (Ed: C. B. Anfinsen). Academic Press, London, pp. 279–402, **1972**.
23. O'Donoghue, S. I., Chang, X., Abseher, R., Nilges, M., Led, J. J., Unraveling the symmetry ambiguity in a hexamer: calculation of the R6 human insulin structure. *J. Biomol. NMR*, 16, 93, **2000**.
24. Smith, G. D., Pangborn, W. A., Blessing, R. H., The structure of T6 human insulin at 1.0 Å resolution. *Acta Crystallogr. D*, 59, 474, **2003**.
25. Ludvigsen, S., Roy, M., Thoegersen, H., Kaarsholm, N. C., High-resolution structure of an engineered biologically potent insulin monomer, B16 tyr to his, as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 33, 7998, **1994**.



26. Gursky, O., Badger, J., Li, Y., Caspar, D. L., Conformational changes in cubic insulin crystals in the pH range 7–11. *Biophys. J.*, 63, 1210, **1992**.
27. Eliuk, S.; Makarov, A. Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 8, 61-80, **2015**.
28. Mehmood, S.; Allison, T. M.; Robinson, C. V. Mass spectrometry of protein complexes: from origins to applications. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 66, 453-474, **2015**.
29. Han, X.; Aslanian, A.; Yates, J. R. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 483-490, **2008**.
30. Domon, B., & Aebersold, R., Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771), 212–217, **2006**.
31. de Hoffmann, E., Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*: Wiley, **2007**.
32. Anonim, Mass Spectrometry Ionization Methods, <http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html> (Erişim tarihi: Nisan **2019**).
33. Grayson, M. A., John Bennett Fenn: a curious road to the prize. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 22 (8), 1301-1308, **2011**.
34. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246 (4926), 64-71, **1989**.

35. Anonim, Quadrupole Mass Analysis, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml> (Erişim tarihi: Nisan **2019**).
36. W.E. Stephens, A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion, *Rev. Sci. Instrum.* 69, 691, **1946**.
37. Cotter, R. J., Time of flight mass spectrometry, *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, **2005**.
38. Eiceman, G., Karpas, Z. *Ion Mobility Spectrometry*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, **2005**.
39. Medhe, S., *Mass Spectrometry: Detectors Review. Chemical and Biomolecular Engineering Vol. 3, No. 4*, pp. 51-58, **2018**.
40. Koppelaar, D.W., Barinaga, C.J., Denton, M.B. et al., Mass spectrometry detectors. *Anal. Chem.*, 419A–27A, **2005**.
41. Kanu, A. B.; Dwivedi, P.; Tam, M.; Matz, L.; Hill, H. H., Ion mobility–mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 43 (1), 1-22, **2008**.
42. Fenn, L. S., Kliman, M., Mahsut, A., Zhao, S. R., & McLean, J. A., Characterizing ion mobility-mass spectrometry conformation space for the analysis of complex biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(1), 235–244, **2009**.
43. Rutherford, E., The velocity and rate of recombination of the ions of gases exposed to rontgen radiation, *Phil. Mag.*, 422–440, ser 5 xlv, **1897**.

44. Rutherford, E., Uranium radiation and the electrical conduction produced by it, *Phil. Mag.*, 109–163, ser 5 xlvii, **1899**.
45. Barnes, W.S., Martin, D.W., McDaniel, E.W., Mass spectrographic identification of the ion observed in hydrogen mobility experiments, *Phys. Rev. Lett.* 6,110–111, **1961**.
46. Steiner, W.E., Harden, C.S., Hong, F., Klopsch, S.J., Hill Jr. H.H., McHugh, V.M., Detection of aqueous phase chemical warfare agent degradation products by negative mode ion mobility time-of-flight mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2), 241–245, **2006**.
47. McKenzie-Coe, A., DeBord, J.D., Ridgeway, M., Park, M., Eiceman, G., Fernandez-Lima, F., Lifetimes and stabilities of familiar explosive molecular adduct complexes during ion mobility measurements, *Analyst* 140 (16) 5692–5699, **2015**.
48. Gidden, J., Bowers, M., Jackson, A., Scrivens, J. Gas-phase conformations of cationized poly(styrene) oligomers, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (5) 499–505, **2002**.
49. Trimpin, S., Clemmer, D.E., Ion mobility spectrometry/mass spectrometry snapshots for assessing the molecular compositions of complex polymeric systems, *Anal. Chem.* 80 (23), 9073–9083, **2008**.
50. Wytenbach, T., von Helden, G., Bowers, M.T., Gas-phase conformation of biological molecules: bradykinin, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (35), 8355–8364, **1996**.

51. Ruotolo, B.T., Benesch, J.L.P., Sandercock, A.M., Hyung, S.J., Robinson, C.V., Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes, *Nat. Protocols* 3 (7), 1139–1152, **2008**.
52. Jiang, W., Robinson, R.A.S., Ion Mobility-Mass Spectrometry, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, **2013**.
53. Ben-Nissan, G., & Sharon, M., The application of ion-mobility mass spectrometry for structure/function investigation of protein complexes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 42, 25–33, **2018**.
54. Uetrecht, C., Rose, R. J., Van Duijn, E., Lorenzen, K., & Heck, A. J. R., Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1633–1655, **2010**.
55. Fernandez-Lima, F. A., Blase, R. C., Russell, D. H., A study of ion-neutral collision cross-section values for low charge states of peptides, proteins, and peptide/protein complexes, *Int. J. Mass Spectrom.*, 298, 111–118, **2010**.
56. Fernandez-Lima, F. A., Wei, H., Gao, Y. Q. ve Russell, D. H. , On the Structure Elucidation Using Ion Mobility Spectrometry and Molecular Dynamics, *J. Phys. Chem. A*, 113, 8221–8234, **2009**.
57. Fernandez-Lima, F. A., Becker, C, McKenna, A. M., Rodgers, R. P., Marshall, A. G., ve Russell, D. H., Petroleum Crude Oil Characterization by IMS-MS and FTICR MS, *Anal. Chem.*, 81, 9941–9947, **2009**.
58. Fernandez-Lima, F. A., Becker, C., Gillig, K., Russell, W. K., Tichy, S. E. and Russell, D. H., Ion Mobility-Mass Spectrometer Interface for Collisional Activation of Mobility Separated Ions, *Anal. Chem.*, 81, 618–624, **2009**.

59. Becker, C., Fernandez-Lima, F. A., Gillig, K. J., Russell, W. K., Cologna, S. and Russell, D. H., A Novel Collision-Induced Dissociation (CID) Experiment for Ion Mobility-Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20, 907–914, **2009**.
60. Fernandez-Lima, F. A., Becker, C., Gillig, K., Russell, W. K., Nascimento, M. A. C., Russell, D. H., Experimental and Theoretical Studies of (CsI)<sub>n</sub>Cs<sup>+</sup> Cluster Ions Produced by 355 nm Laser Desorption Ionization, *J. Phys. Chem. A*, 112, 11061–11066, **2008**.
61. D’Atri, V., Causon, T., Hernandez-Alba, O., Mutabazi, A., Veuthey, J-L., Cianferani, S., Guillarme, D., Adding a new separation dimension to MS and LC-MS: What is the utility of ion mobility spectrometry? *Journal of Separation Science*, 20-67, **2018**.
62. May, J. C., & McLean, J. A., Ion Mobility-Mass Spectrometry: Time-Dispersive Instrumentation. *Analytical Chemistry*, 87(3), 1422–1436, **2015**.
63. Atakay M., Model Sentetik Polimerlerin ve Komplekslerinin Gaz Fazı Karakteristiklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2016**.
64. Tung, L. S., Barr, W., Lowder, R., Post, R., Mass, charge, and energy separation by selective acceleration with a traveling potential hill, *Journal of applied physics*, 80, 3646-3655, **1996**.
65. Buryakov, I., Krylov, E., Nazarov, E., Rasulev, U. K., A new method of separation of multi-atomic ions by mobility at atmospheric pressure using a high-frequency amplitude-asymmetric strong electric field, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 128, 143-148, **1993**.

66. Kolakowski, B. M., Mester, Z., Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS), *Analyst*, 132, 842-864, **2007**.
67. Purves, R. W., Guevremont, R., Day, S., Pipich, C. W., Matyjaszczyk, M. S., Mass spectrometric characterization of a high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometer, *Review of Scientific Instruments*, 69, 4094-4105, **1998**.
68. Lambertus, G. R., Fix, C. S., Reidy, S. M., Miller, R. A., Wheeler, D., Nazarov, E., Sacks, R., Silicon microfabricated column with microfabricated differential mobility spectrometer for GC analysis of volatile organic compounds, *Analytical chemistry*, 77, 7563-7571, **2005**.
69. De La Mora, J. F., Ude, S., Thomson, B. A., The potential of differential mobility analysis coupled to MS for the study of very large singly and multiply charged proteins and protein complexes in the gas phase, *Biotechnology journal*, 1, 988-997, **2006**.
70. Hogan Jr, C. J., Ruotolo, B. T., Robinson, C. V., Fernandez de la Mora, J., Tandem differential mobility analysis-mass spectrometry reveals partial gas-phase collapse of the GroEL complex, *The Journal of Physical Chemistry B*, 115, 3614-3621, **2011**.
71. Vidal-de-Miguel, G., Macía, M., Cuevas, J., Transversal Modulation Ion Mobility Spectrometry (TM-IMS), a new mobility filter overcoming turbulence related limitations, *Analytical chemistry*, 84, 7831-7837, **2012**.
72. Revercomb, H. E., Mason, E. A., Theory of plasma chromatography/gaseous electrophoresis. Review, *Anal. Chem.* 47 (7), 970-983, **1975**.

73. Mason, E. A., McDaniel, E. W., *Transport Properties of Ions in Gases*, Wiley, New York, **1988**.
74. Wyttenbach, T., Kemper, P. R., Baykut, G., Park, M. A. ve Bowers, M. T., A new instrument with high mass and high ion mobility resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*, 434, 108–115, **2018**.
75. Fernandez-Lima, F. A., Kaplan, D. A. ve Park, M. A., Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer, *Int. J. Ion Mobility Spectrom.*, 14, 93–98, **2011**.
76. Fernandez-Lima, F. A., Kaplan, D. A. ve Park, M. A., Integration of trapped ion mobility spectrometry with mass spectrometry, *Rev. Sci. Instrum.*, 82, 126106, **2011**.
77. Meyer, S. W., Sander, P, Michalski, A., Suckau, D., High resolution trapped ion mobility mass spectrometry for analysis of isomeric compound, *Bruker Daltonics*, **2016**.
78. Hernandez, D. R., DeBord, J. D., Riggeway, M. E., Kaplan, D. A., Park, M. A. ve Fernandez - Lima, F., Ion dynamics in a trapped ion mobility spectrometer, *Analyst*, 139, 1913, **2014**.
79. Ridgeway, M. E., Lubeck, M., Jordens, J., Mann, M., & Park, M. A., Trapped ion mobility spectrometry: A short review. *International Journal of Mass Spectrometry*, 425, 22–35, **2018**.
80. Michelmann, K., Silveira, J., Ridgeway, M., Park, M., Fundamentals of trapped ion mobility spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (1) ,14–24, **2015**.

81. Silveira, J.A., Michelmann, K., Ridgeway, M.E., Park, M., Fundamentals of trapped ion mobility spectrometry part II: fluid dynamics, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (4), 585–595, **2016**.
82. Park M.A., Apparatus and Method for Parallel Flow Ion Mobility Spectrometry Combined with Mass Spectrometry, US Patent 8, 288, 717, **2010**.
83. F. Fernandez-Lima, D.A. Kaplan, M.A. Park, Integration of trapped ion mobility spectrometry with mass spectrometry, *Rev. Sci. Instrum.* 82, 126106, **2011**.
84. Konijnenberg, A., Butterer, A., Sobott, F., Native ion mobility – mass spectrometry and related methods in structural biology, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834, 1239 – 1256, **2013**.
85. Taron, C. H., & Benner, J. S., Physical and computational analysis of the yeast *Kluyveromyces lactis* secreted proteome, 2714–2723, **2008**.
86. Fávero-Retto, M. P., Palmieri, L. C., Souza, T. A. C. B., Almeida, F. C. L., & Lima, L. M. T. R. Structural meta-analysis of regular human insulin in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3 PART B), 1112–1121, **2013**.
87. Fávero-Retto, M. P., Guerreiro, L. H., Pessanha, C. M., Palmieri, L. C., & Lima, L. M. T. R., Polymorphic distribution of proteins in solution by mass spectrometry: The analysis of insulin analogues. *Biologicals*, 45, 69–77, **2017**.
88. Wilkins CL, Trimpin S. Ion mobility spectrometry-mass spectrometry : theory and applications, **2010**.



89. Data Analysis 5.0, What is new?, Bruker Daltonics Corporation, **2016**.
90. Tremintin, G., Suckau, D., Pengelley, S., Fast peptide mapping and sensitive host cell proteins detection using timsTOF Pro, Bruker Daltonics, Bremen, Germany, **2018**.
91. Meyer, S. W., Sander, P., Kaplan, D., Suckau, D., Analysis of propolis extracts and isomeric flavonoid mixtures using trapped ion mobility spectrometry (TIMS), Bruker Daltonics, Bremen, Germany, **2016**.
92. Lanucara, F., Holman, S. W., Gray, C. J., & Eyers, C. E., The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*, 6(4), 281–294, **2014**.
93. Chouinard, C. D., Cruzeiro, V. W. D., Roitberg, A. E., Yost, R. A., Experimental and Theoretical Investigation of Sodiated Multimers of Steroid Epimers with Ion Mobility – Mass Spectrometry, *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, **2016**.
94. Greene, S. A., Smith, M. A., Cartwright, B., Baum, J. D., Comparison of human versus porcine insulin in treatment of diabetes in children, *BMJ*, 287 (6405), 1578 – 1579, **1983**.
95. Pingel, M., Volund, A., Sorensen, E., Collins, J. E., Dieter, C. T., Biological potencies of porcine, bovine and human insulins in the rabbit bioassay system, *Diabetologia*, 862 – 869, **1985**.

## EKLER

### EK 1 – İnsan insülininin amonyum asetat ile hazırlanmış çözeltisinin iyon kaynağı sıcaklığı ve kapiler voltajı değişimine göre belirli iyonlarının etkin çarpışma kesiti (CCS) ve hareketlilik ( $1/K_0$ ) değerleri

Çizelge 1. Amonyum asetat ile hazırlanmış insan insülininin farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleşen TIMS - TOF - MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer iyonunun ( $m/z:1660,1857$ ) etkin çarpışma kesitleri ve hareketlilik değerleri.

İyon Kaynağı sıcaklığı	CCS ( $\text{\AA}^2$ )	Hareketlilik ( $1/K_0$ ) ( $\text{V.s/cm}^2$ )
60	1824,2	1,291
80	1798,2	1,272
100	1811,2	1,281
120	1809,3	1,28
140	1815,7	1,284
160	1730,1	1,224
180	1736	1,228
200	1728,6	1,223
220	1716,8	1,215
240	1649,9	1,199
260	1677,5	1,187
280	1772,8	1,254
300	1736,5	1,228
320	1684,7	1,192

Çizelge 2. Amonyum asetat ile hazırlanmış insan insülininin farklı kapiler voltajı değerlerinde gerçekleşen TIMS - TOF - MS analizlerinden elde edilen +7 yüklü dimer iyonunun ( $m/z:1660,1857$ ) etkin çarpışma kesitleri ve hareketlilik değerleri.

Kapiler Voltaj	CCS (A <sup>2</sup> )	Hareketlilik (1/K0) (V.s/cm <sup>2</sup> )
1000 V	1844,1	1,305
1200 V	1809,3	1,28
1400 V	1807,7	1,279
1600 V	1748,5	1,237
1800 V	1803,6	1,276
2000 V	1745	1,234
2200 V	1800,5	1,274
2400 V	1739,7	1,231
2600 V	1791,1	1,267
2800 V	1786,4	1,264
3000 V	1749,6	1,238

Çizelge 3. Amonyum asetat ile hazırlanmış insan insülininin farklı iyon kaynağı sıcaklığı değerlerinde gerçekleşen TIMS - TOF - MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer iyonunun (m/z:1936,8829) etkin çarpışma kesitleri ve hareketlilik değerleri.

İyon Kaynağı sıcaklığı	CCS (Å <sup>2</sup> )	Hareketlilik (1/K0) (V.s/cm <sup>2</sup> )
60	973,9	1,61
80	956,3	1,58
100	946,6	1,564
120	944,2	1,56
140	959,9	1,586
160	902,9	1,492
180	907,5	1,5
200	904,6	1,495
220	898	1,484
240	888,9	1,469
260	879,9	1,454
280	868,5	1,435
300	851,4	1,407
320	823	1,36

Çizelge 4. Amonyum asetat ile hazırlanmış insan insülininin farklı kapiler voltaj değerlerinde gerçekleşen TIMS - TOF - MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer iyonunun (m/z:1936,8829) etkin çarpışma kesitleri ve hareketlilik değerleri.

Kapiler Voltaj	CCS (Å <sup>2</sup> )	Hareketlilik (1/K0) (V.s/cm <sup>2</sup> )
1000	951,9	1,573
1200	944,2	1,56
1400	944,1	1,56
1600	943,5	1,559
1800	942,6	1,558
2000	941,7	1,556
2200	940,5	1,554
2400	938,4	1,551
2600	936,9	1,548
2800	933,2	1,542
3000	928,7	1,535

Çizelge 5. Amonyum asetat ile hazırlanmış insan insülininin farklı kapiler voltaj değerlerinde gerçekleşen TIMS - TOF - MS analizlerinden elde edilen +3 yüklü monomer iyonunun (m/z:1936,8829) etkin çarpışma kesitleri ve hareketlilik değerleri.

İyon kaynağı sıcaklığı	CCS (Å <sup>2</sup> )	Hareketlilik (1/K0) (V.s/cm <sup>2</sup> )
60	1639,6	1,355
80	1639,7	1,355
100	1623,9	1,342
120	1710,3	1,413
140	1635,1	1,351
160	1542	1,274
180	1554,9	1,285
200	1554,3	1,284
220	1539,6	1,272
240	1516	1,253
260	1502,9	1,242
280	1484,8	1,227
300	1452,7	1,2
320	1412,1	1,167

Çizelge 6. Amonyum asetat ile hazırlanmış insan insülininin farklı kapiler voltaj değerlerinde gerçekleşen TIMS - TOF - MS analizlerinden elde edilen +6 yüklü dimer iyonunun (m/z:1936,8829) etkin çarpışma kesitleri ve hareketlilik değerleri.

Kapiler Voltaj	CCS (Å <sup>2</sup> )	Hareketlilik (1/K0) (V.s/cm <sup>2</sup> )
1000	1601,5	1,323
1200	1710,3	1,413
1400	1619,6	1,338
1600	1614,2	1,334
1800	1615,2	1,335
2000	1586	1,311
2200	1582,9	1,308
2400	1610,5	1,331
2600	1606,9	1,328
2800	1602,2	1,324
3000	1594,8	1,318



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 17/07/2019

Tez Başlığı: TUZAKLAMALI İYON HAREKETLİLİĞİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE İNSAN İNSÜLİNİ VE ANALOGLARININ ANALİZİ

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 105 sayfalık kısmına ilişkin, 17/07/2019 tarihinde ~~17/07/2019~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'tir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Nimet Büyükköy  
Öğrenci No: N12229422  
Anabilim Dalı: Kimya  
Programı: Tezli Yüksek Lisans  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

17.07.2019

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Bekir Salih  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

# ÖZGEÇMİŞ

## **Kimlik Bilgileri**

Adı Soyadı : Nimet BÜYÜKKÖY

Doğum Yeri : Kütahya

Medeni Hali : Evli

E – posta : nimetbuyukkoy@gmail.com

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Kimya Bölümü, Kütle Spektrometrisi Laboratuvarı, 06800, Ankara/ TÜRKİYE

## **Eğitim**

Lisans : Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Matematik ve Fen Alanları Eğitimi Bölümü, Kimya Öğretmenliği, Tezsiz Yüksek Lisans.

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

## **Yabancı Dil Düzeyi**

İngilizce : İyi

## **Program Bilgisi**

MS Office

## **İlgi Alanları**

İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi, Biyomolekül Analiz Teknikleri.