

SERUM NMR T₁ DURULMASI İÇİN ÖNERİLEN TABAKA MODELİNDEN KİMYASAL DEĞİŞ-OLUŞ FORMÜLLERİNİN TÜRETİMİ

The Derivation of Chemical Exchange Formulas for Serum NMR T₁ Relaxation by Using Layer Model

Gülten KAVAK¹
F. Şadan ULAK²

Özet

Bu çalışmada, protein hidrasyonunun tabaka modeli göz önüne alınarak (bulk su, engellenmiş su, dönerek bağlı ve dönmeden bağlı su) serum 1/T_i (i:1 ve 2) durulması için bir formül yazıldı. Yapılan hesaplar sonucunda elde edilen formülün serbest su ile bağlı su arasındaki hızlı kimyasal değiş-tokuşu anlatan formül ile aynı olduğu görüldü. Bu sonuç, bir protein çözeltisinin serbest ve bağlı su durumları arasındaki hızlı kimyasal değiş-tokuşa ait 1/T_i formüllerinin, tabaka modeli ile önerilen ortalama ile aynı olduğunu önermektedir.

Anahtar Kelimeler: ¹H NMR, tabaka modeli, rölaksasyon zamanları, serum, kimyasal değiş-tokuş

Abstract

In this study, a formula was written for relaxation rate of serum 1/T_i (i: 1 and 2) by using the layer model of protein hydration (bulk water, hindered water, rotationally bound water, irrotationally bound water). Then a new formula, which is similar to the formula related to fast chemical exchange between free and bound water, was obtained from the first one. This result suggest that the 1/T_i formula based on the layer model is identical to that of the fast chemical exchange between free and bound states.

Key words: ¹H NMR, layer model, relaxation times, serum, chemical exchange

Giriş

Serumun %8'ini albümin γ , α ve β -globülinleri gibi temel proteinlerden ve %92'si de sudan oluşmaktadır. Serumdaki su, serum proteinlerine bağlanmakta ve ayrıca da serbest fazda da bulunmaktadır. Protein çözeltilerindeki durulma ölçümleri için çok sayıda çalışma yapılmış ve değişik modeller önerilmiştir (Bertini, Fragai, Luchinat & Parigi, 2000; Bertini, Gupta, Luchinat, Schlörb, Luchinat & Schwalbe, 2005; Blicharska & Rydzy, 1979; Cameron, Ord & Fullerton 1988; Daszkiewicz, Hennel & Lubas, 1963;

¹ Yrd.Doç.Dr.; Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Genel Fizik Anabilim Dalı, 21280-Diyarbakır, gulten@dicle.edu.tr

² Yrd.Doç.Dr.; Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Genel Fizik Anabilim Dalı, 21280-Diyarbakır, e-mail: sadanulak@hotmail.com

Fullerton, Ord & Cameron, 1986; Fullerton, Finnie, Hunter Ord & Cameron, 1987; Gallier, Rivet & Certaines, 1987; Grösch & Noack, 1976; Halle, 2004). Bu modellerden birisi de tabaka modelidir. Tabaka modeline göre bir proteinin etrafındaki su, bulk su, etkilenmiş(engellenmiş) su ve proteinlere bağlı su (dönerek ve dönmesiz bağlı) su olarak sınıflandırılabilir (Bertini, Gupta & Luchinat, 2005; Blicharska & Rydzy, 1979; Fullerton, Ord & Cameron, 1986; Fullerton, Finnie, Hunter, Ord & Cameron, 1987; Grösch & Noack, 1976; Kavak, 2000). Bütün bu tabakalardaki suların birbirleri ile hızlı olarak değiş-tokuş yaptığı da bilinmektedir. Ayrıca protein çözeltisi dehidrasyona uğratıldığında; önce bulk suyun, sonra engellenmiş suyun, en sonunda da bağlı suların tükendiği varsayılmıştır. Her tabakaya ait suyun buharlaşması $1/T_1$ ' in M_p/M_s (Proteinin kütlesi/Suyun kütlesi)' ne karşı grafiklenmesinden elde edilen doğru parçaların vasıtası ile temsil edilebileceği de önerilmiştir. Diğer bir söyleyişle; $1/T_1$ ' in M_p/M_s ' ya karşı grafiklenmesi ile, bulk suyun tüketimi boyunca birinci doğru, engellenmiş suyun tüketimi boyunca ikinci bir doğru ve bağlı suların tüketimi boyunca da yeni doğrular ortaya çıkacağı varsayılmıştır (Cameron, Ord & Fullerton 1988; Fullerton, Ord & Cameron, 1986; Fullerton, Finnie, Hunter, Ord & Cameron, 1987). Diğer taraftan, protein çözeltilerinin durulmasının hızlı kimyasal değiş-tokuş formülleri ile ifade edildiği de bilinmektedir (Daszkiewicz, Hennel & Lubas, 1963; Kavak, 2000; Blicharska & Rydzy, 1979). Ancak tabaka modeli de hızlı kimyasal-değiş tokuş içerdiğine göre; tabaka modeline ait formüller, hızlı-kimyasal değiş-tokuş formüllerine indirgenebilmelidir. Bu işlem bu güne dek yapılmamış ve iki modelin aslında eşdeğer olduğu ortaya konmamıştır. Bu çalışmada yukarıda anlatılan varsayımlar dikkate alınarak ve tabaka modeli geçerli sayılarak, serum durulması için bir formül geliştirildi ve bu formül hızlı kimyasal değiş-tokuşu ifade eden en basit formül biçimine indirgendi.

Teorik Bağıntının Türetilmesi

Eğer tabaka modeli geçerli ve tabakalar arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş varsa; ölçülen $1/T_{iölç}$ oranı (i: 1= T_1 ve i:2 = T_2) çeşitli tabakalar arasındaki suyun bireysel $1/T_1$ ve $1/T_2$ değerlerinin ortalaması olarak verilir. Serumdaki proteinlerin etrafında 4 tabakanın varlığı kabul edildiğinden, bu oran

$$R_{iölç} = \frac{1}{T_i} = \frac{f_s}{T_{is}} + \frac{f_{öe}}{T_{iöe}} + \frac{f_{db}}{T_{idb}} + \frac{f_{dmb}}{T_{idmb}} \quad i:1,2 \quad (1)$$

olarak yazılır (Fullerton, Finnie, Ord & Cameron, 1987; Grösch & Noack, 1976). Burada: $1/T_{iölç}$; ölçülen spin-örgü durulma oranını, $1/T_{2ölç}$; ölçülen spin-spin durulma oranını, f_s , $f_{öe}$, f_{db} , f_{dmb} nicelikleri sırasıyla; serbest, ötelemesi engellenmiş, dönerek bağlı, dönmesiz bağlı suyun fraksiyonlarını ve $1/T_{is}$, $1/T_{iöe}$, $1/T_{idb}$ ve $1/T_{idmb}$ durulma oranları ise sırasıyla, serbest,

ötelemesi engellenmiş, dönerek bağlı ve dönmesiz bağlı suyun durulma oranlarını göstermektedir. (1) denklemindeki terimler

$$f_s = \frac{M_s}{M_{su}} ; f_{\ddot{o}e} = \frac{M_{\ddot{o}e}}{M_{su}} ; f_{db} = \frac{M_{db}}{M_{su}} ; f_{dmb} = \frac{M_{dmb}}{M_{su}}, \quad (2)$$

$$f_s + f_{\ddot{o}e} + f_{db} + f_{dmb} = 1, \quad \dots \quad (3)$$

$$M_{su} = M_s + M_{\ddot{o}e} + M_{db} + M_{dmb} \quad (4)$$

ve

$$M_{db} = b_{db} M_{katı}, \quad (5)$$

$$M_{dmb} = b_{dmb} M_{katı} \quad (6)$$

$$M_{\ddot{o}e} = (h - b) M_{katı} \quad \dots \quad (7)$$

şeklinde ifade edilmektedir(2). (2) den (7)'ye kadar olan denklemleri kullanarak, (1) denklemi üzerinde çalışalım. Bu durumda

$$\frac{1}{T_{iölç}} = R_{1ölç} = (1 - f_{\ddot{o}e} - f_{db} - f_{dmb}) R_{is} + \frac{M_{\ddot{o}e}}{M_{su}} R_{i\ddot{o}e} + b_{db} \frac{M_{katı}}{M_{su}} R_{idb} + b_{dmb} \frac{M_{katı}}{M_{su}} R_{idmb}$$

$$= R_{is} + \left[-b_{db} R_{is} - b_{dmb} R_{is} + b_{db} R_{idb} + b_{dmb} R_{idmb} \right] \frac{M_{katı}}{M_{su}} + (R_{i\ddot{o}e} - R_{is}) \frac{M_{\ddot{o}e}}{M_{su}}$$

$$= R_{is} + \left[-b_{db} R_{is} - b_{dmb} R_{is} + b_{db} R_{idb} + b_{dmb} R_{idmb} \right] \frac{M_{katı}}{M_{su}} + (R_{i\ddot{o}e} - R_{is}) \frac{(h - b) M_{katı}}{M_{su}}$$

$$R_{1ölç} = R_{is} + \left[-b_{db} R_{is} - b_{dmb} R_{is} + b_{db} R_{idb} + b_{dmb} R_{idmb} + (R_{i\ddot{o}e} - R_{is})(h - b) \right] \frac{M_{katı}}{M_{su}} \quad (8)$$

şekline girer. Köşeli parantez içindeki terim

$$R = -b_{db} R_{is} - b_{dmb} R_{is} + b_{db} R_{idb} + b_{dmb} R_{idmb} + (R_{i\ddot{o}e} - R_{is})(h - b)$$

şeklinde tanımlanırsa, 8 denklemi

$$\frac{1}{T_{iölç}} = R_{iölç} = R_{is} + R \frac{M_{katı}}{M_{su}} = R_{is} + mC \quad (9)$$

formülüne indirgenir. Burada $\frac{R}{M_{su}} = m$ ve $M_{katı} = C$ olarak alınmıştır.

Diğer yandan bir protein çözeltisindeki $1/T_1$ ile protein konsantrasyonu arasındaki ilişki

$$\frac{1}{T_{1ölç}} = \frac{1}{T_{1su}} + mC \quad (10)$$

olarak verilir. Denklem 10 hızlı kimyasal değiş-tokuş varlığındaki durulmayı ifade etmektedir (Daszkiewicz, Hennel & Lubas, 1963; Eley, Hey & Ward, 1974). Bu denklem (Denklem 10), yukarıda türetilen Denklem 9 ile aynı formda olmaktadır. Denklem 10, sadece serbest su ile bağlı su arasındaki hızlı değiş-tokuşu anlatır ve su için iki durumu (serbest su –bağlı su) esas alır. Formülün yapısındaki benzerlikten dolayı, 9 formülü de serbest su ile bağlı su arasındaki hızlı değiş tokuşu anlatacağı açıktır. Ancak bu kez tabakaları içeren sistemin yerine, sadece bağlı su ve serbest su durumlarını dikkate alan bir eşdeğer sistem düşünülmüştür. Bu demektir ki, iki durum arasındaki hızlı kimyasal değiş-tokuşu anlatan Denklem 10, aslında tabaka modelindeki ortalamayı temsil etmektedir.

Tartışma

1960' lı yıllarda yapılan çalışmalarda protein çözeltilerindeki su, serbest su ve bağlı su olarak düşünülmüştür (Daszkiewicz, Hennel & Lubas, 1963). Daha sonraki çalışmalarda, serbest su, engellenmiş su ve bağlı su olarak tabakaların sayısı artmıştır (Gallier, Rivet & Certaines, 1987; Grösch & Noack, 1976). Bağlı su tabakası da, dönmeli bağlı ve dönmesiz bağlı olmak üzere, iki ayrı tabakaya dönüşmüştür (Cameron, Ord & Fullerton 1988; Fullerton, Finnie, Hunter, Ord & Cameron, 1987). Varsayım olarak öne sürülen bu tabakalar, M_p/M_s 'ya karşı yapılan $1/T_1$ ölçümleri yolu ile ortaya konulmaya çalışılmıştır (Cameron, Ord & Fullerton 1988; Fullerton, Finnie, Hunter, Ord & Cameron, 1987). Bazı çalışmalarda ise bu tabakalardaki suyun durulma mekanizmaları ortaya konulmuştur (Bertini, Fragai, Luchinat & Parigi, 2000; Yoshioki, 2002). Ancak tabakaların sayısı üzerinde sözbirliği mevcut değildir (Cameron, Ord & Fullerton 1988; Daszkiewicz, Hennel & Lubas, 1963; Fullerton, Ord & Cameron, 1986; Fullerton, Finnie, Hunter, Ord & Cameron, 1987; Grösch & Noack, 1976; Gallier, Rivet & Certaines, 1987; Pouliquen & Gallois, 2001, Bertini, Fragai, Luchinat & Parigi, 2000; Yoshioki, 2001).

Grubumuz tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, derece derece sulandırılmış serum örneklerinden elde edilen m_1 ve m_2 değerleri, sırası ile $0.042(\text{g/dl})^{-1} \text{ s}^{-1}$ ve $0.38(\text{g/dl})^{-1} \text{ s}^{-1}$ olmaktadır. (Yılmaz, Ulak & Batun, 2004).

Yine grubumuzca Mp/Ms' ya karşı ölçülen serum durulma zamanlarının tabaka modeline göre yorumlanmasından elde edilen sonuçların denklem 8 ve de 9'a yerleştirilmesinden benzer m_1 ve m_2 değerleri elde olmaktadır (Yılmaz, Tez, Kavak, Taylan & Yurt, 2001). Tüm bu nedenlerle denklem 9 ile ifade edilen teorik bağıntı, daha önce yapılan deneysel sonuçlar ile tutarlıdır.

Sonuç

Bu inceleme, bir protein çözeltisinin serbest ve bağlı su durumları arasındaki hızlı kimyasal- değiş tokuşa ait $1/T_1$ formüllerinin, tabaka modelinden türetilbileceğini önermektedir.

Kaynaklar

- Bertini, I, Fragai, M., Luchinat, C. & Parigi, G. (2000). ^1H NMRD profiles of diamagnetic proteins: a model-free analysis. *Magn. Reson. Chem.*, 38,543-550.
- Bertini, I., Gupta, Y. K. Luchinat, C. Schlörb, C. & Schwalbe, H. (2005). NMR Spectroscopic detection of protein protons and longitudinal relaxation rates between 0.01 and 50 MHz, *Angew. Chem*, 117, 2263-2265.
- Blicharska, B. & Rydzy, M. (1979). Investigation of protein denaturation by nuclear magnetic relaxation method, *Acta Physica Polonica*, A56, 439-443.
- Cameron, I. L, Ord, V. A. & Fullerton, G. D. (1988). Water of hydration in the intra and extra cellular environment of human erythrocytes. *Biochem.Cell.Biol.*, 66,1186-1199.
- Daskiewicz, O. K., Hennel, J. W. & Lubas, B. (1963). Proton magnetic relaxation and protein hydration, *Nature*, 200,1006-1007.
- Eley, D. D., Hey, M. J. & Ward, A. J. I. (1974). Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Aqueous Bovine Albumin Solutions, *J.Chem.Soc.Faraday Transact.I*, 5,1106-1113.
- Fullerton, G. D., Ord, V. A. & Cameron, I.L. (1986). An evaluation of the hydration of lysozyme by a NMR titration method. *Biochim.Biophys.Acta*, 869,230-246.
- Fullerton, G.D., Finnie, M. F., Hunter, K. E., Ord, A. & Cameron, I. L. (1987). The influence of macromolecular polymerization on spin-lattice relaxation of aqueous solutions, *J.Magn.Reson.Imaging*, 5,353-370.
- Gallier, J., Rivet, P. & Certanes, J.de. (1987). ^1H - and ^2H -NMR study of bovine serum albumin solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 915,1-18.
- Grösch, L. & Noack, F. (1976). NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 453,218-232.
- Halle, B. (2004). Protein hydration dynamics in solution: a critical survey, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 359,1207-1224.
- Kavak, G. (2000). "Serum Proteinlerinin Spin-Örgü Durulma Mekanizmalarının NMR ile incelenmesi". Yayımlanmış doktora tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Pouliquen, D. & Gallois, Y. (2001). Physicochemical properties of structured water in human albumin and gammaglobulin solutions. *Biochimie.*, 83,891-898.
- Yılmaz, A., Ulak F. Ş. & Batun, M.S. 2004. Proton T1 and T2 relaxivities of serum proteins, *Magnetic Resonance Imaging*, 22(7) 683-688.