

SERUMDAKİ PROTEİN HİDRASYONUNUN NMR T₁ ÖLÇÜMLERİ İLE İNCELENMESİ

The Investigation of Protein Hydration in Serum by T₁ Relaxation Measurement

Gülten KAVAK¹

Özet

Bu çalışmada bir serum örneğinin spin-örgü durulma zamanı(T₁) ölçümleri, bu örneğe kademe kademe albümin eklenerek ve inversion-recovery(IR) puls adımı kullanılarak, 60 MHz' de çalışan bir FT-NMR ile ölçüldü. Her albümin ekleden sonra saptanan 1/T₁ oranları, o andaki Ma/Ms(albümin kütlesi/su kütlesi) oranına karşı grafiklendi. Böyle bir grafik, ucuca ekli dört doğru parçası vermektedir. Bir protein molekülünü saran su bölümlerinin, eklenen albümin vasıtası ile, dıştan içe doğru tükendiği varsayılmıştır. Bulunan doğru parçaları: serbest su, engellenmiş su, dönerek ve dönmeyerek bağlı su tabakalarına atfedildi. Bu doğrulara ait verilerden, bir gram proteine düşen su miktarı: 4,71 g (serbest), 1,5 g (engellenmiş), 0,38g(dönerek bağlı) ve 0,05 g (dönmeden bağlı) olarak bulundu. Bu bölümlere ait durulma oranları ise sırası ile, 0,59s⁻¹ (serbest), 0,95s⁻¹ (engellenmiş),1,83 s⁻¹ (dönerek bağlı) ve 3,82 s⁻¹ (dönmeden bağlı) olarak saptandı.

Sonuçlar serbest ve hidrasyon suyu arasında su moleküllerinin hızlı kimyasal değiş-tokuş mekanizmasına dayanan durulma modeli ile tutarlı bulundu. Bloembergen, Purcell ve Pound tarafından ortaya konan durulma bağıntıları kullanılarak, serbest, engellenmiş, dönerek bağlı ve dönmesiz bağlı tabakaların τ ilgi zamanları sırası ile 10⁻¹²s, 5*10⁻¹⁰s, 1,2*10⁻⁹s ve 10⁻⁷s olarak saptandı. Literatürle uyumlu bulunan bu sonuçlar, bir çözeltideki hidrasyon suyunun çeşitli bölümlerine ait durulma zamanı ve su miktarlarının, protein ilavesine karşılık yapılan T₁ ölçümleri ile saptanabileceğini önermektedir.

Anahtar Kelimeler: Albümin, T₁ spin-örgü durulma zamanı, τ ilgi zamanı

Abstract

In this study; T₁ relaxation times were measured for serum doped albumin with FT-NMR spectrometer operating at 60 MHz. and using inversion-recovery pulse sequences (IR). After each albumin addition, spin-lattice relaxation rates (1/T₁) were measured and plotted against mass albumin/mass water. The plotting gives four successive line segments. The water layers surrounding the protein molecule are assumed to be consistently exhausted from outer shell to inner shell by adding albumin. The obtained line segments were attributed to free, hindered water, rotationally bound and irrotationally bound water layers. Using the line segments, the mass of water per 1 g of protein were obtained 4,71 g(free), 1,5 g(hindered), 0,38g(rotationally bound) and 0,05g (irrotationally bound). The relaxation rates of this layers were determined as

¹ Yrd.Doç.Dr.; Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Genel fizik ABD, 21280 Kampüs – Diyarbakır, gulten@dicle.edu.tr

follows; $0.59s^{-1}$ (free), $0.95s^{-1}$ (hindered), $1.83s^{-1}$ (rotationally bound) and $3.82s^{-1}$ (irrotationally bound).

These results were consistent with relaxation model based on fast chemical exchange mechanism of water molecules between free and hydration water. Using the relaxation rate and the dipolar relaxation formula found by Bloembergen, Purcell and Pound, correlation times τ were determined for free, hindered, rotationally bound and irrotationally bound layers; $10^{-12}s$, $5*10^{-10}s$, $1.2*10^{-9}s$ ve $10^{-7}s$, respectively. These results suggest that the relaxation times of water layers surrounding a protein and amount of water in each layer could be determined by T_1 measured versus addition protein.

Anahtar Kelimeler: Albumin, T_1 relaxation times, τ correlation times;

Giriş

Sağlıklı serum örneklerinin spin-örgü durulma (T_1) ölçümleri 1970' in ortalarından bu yana çok sayıda araştırmacı tarafından tekrarlanmış ve T_1 durulmasına katkıda bulunan serum bileşenleri su, diamagnetik proteinler ve transferin olarak açıklanmıştır (Brooks, Battocletti, Sances, Larson, Bowman & Kudravcev, 1975; Koivula, Suominen, Timonen & Kiviniitty, 1982; Raeymaekers, Borghys & Eisendrath, 1988; Yılmaz, Chu, Osmanoğlu, 1988; Yılmaz, Otludil, Batun, Ensari, Longo & Palma, 1992; Yılmaz, Budak & Longo, 1998). Durulma mekanizmasının serbest su ile proteinlere bağlı su arasındaki hızlı kimyasal değiş-tokuştan ileri geldiği varsayılmıştır (Brooks, Battocletti, Sances, Larson, Bowman & Kudravcev, 1975; Koivula, Suominen, Timonen & Kiviniitty, 1982). Donmuş örnekler ve döteryum katılmış örnekler üzerinde yapılan durulma ölçümlerden, bağlı su kendi arasında: Engellenmiş (hindered), dönmeden (irrotationally) ve dönerek bağlı (rotationally bound) su gibi bazı alt bölümlere ayrılmıştır (Fullerton, 1988; Grösch & Noack, 1976). Ancak doğrudan serum kullanılarak, serum proteinlerine bağlı su bölümlerinin durulma zamanları incelenmemiştir.

1980 ortalarından itibaren, lizozim çözeltileriyle yapılan incelemelerden, proteine bağlı su bölümlerinin her birinin T_1 değerini, ilgi zamanlarını ve su miktarlarını açıklayan yeni bir yöntem açıklanmıştır (Fullerton, Ord & Cameron, 1986). NMR titrasyon (dehidrasyon) metodu denilen bu teknik: (1) buharlaştırma yolu ile çözüldüdeki protein oranının artırılması olgusuna, (2) protein etrafındaki su bölümlerinin dıştan içe sıra ile buharlaştığı varsayımına dayanmaktadır. Bu tip dehidrasyon ile serumdaki su bölümlerinin durulma zamanları ve su miktarları üzerine de bilgi edinilmiştir (Cameron, Ord & Fullerton, 1988). Ancak örnekteki suyun buharlaşması aylara varan bir zaman aldığından, serumda oluşan mikrobik kökenli bozulmalar ve spektrometreden ileri gelebilecek zamana bağlı hatalar göz ardı edilemez. Bu ise daha hızlı bir dehidrasyon tekniğine hala gereksinim olduğunu ortaya koyar.

Bir serum örneğinin temel proteinleri, yaklaşık olarak albümin (4-6)g/dl ve γ -globülin (2-2.5)g/dl konsantrasyonda olmaktadır (Kavak, 2000; Yılmaz, Ulak & Batun, 2004). Buharlaştırma yolu ile serumdaki protein miktarı arttırılacağına, albümin ya da globülin ekleyerek de protein

konsantrasyonu arttırılabilir. Bu ise daha hızlı dehidrasyon sağlayarak, daha az hata içeren T_1 ölçümleri verir.

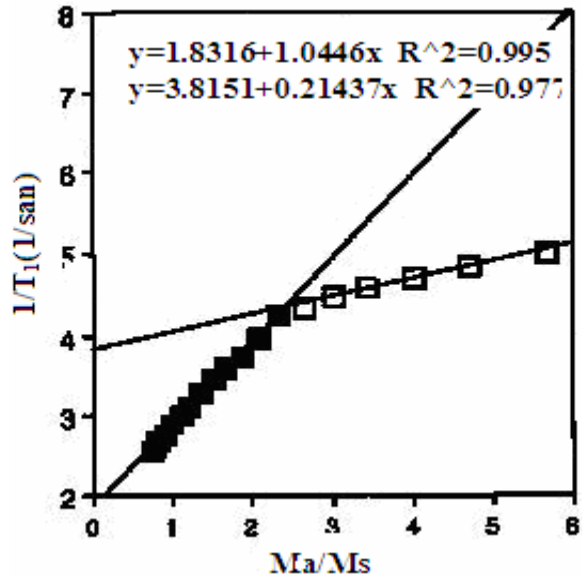
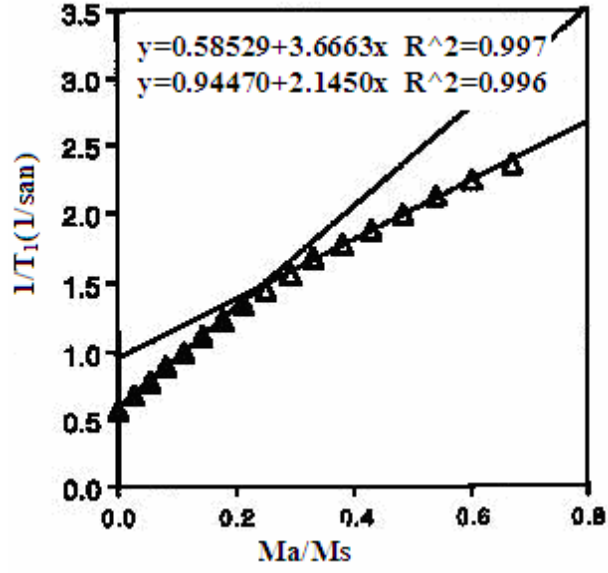
Bu çalışmada serum örneğine ardışık olarak eklenen albümin konsantrasyonlarına karşı ölçülen NMR- T_1 spin-örgü durulma verileri kullanılarak, serumun çeşitli hidrasyon tabakalarına ait durulma oranları ve su miktarları saptandı.

Materyal ve Metod

Normal bir gönüllüden alınan kan heparinsiz ve citratsızdır. Kan alındıktan hemen sonra santrifuj işlemine tabi tutularak 2 ml' lik serum örneği elde edilmiştir. Sigma' dan satın alınan toz insan serum albümini (%96-99'u agaros jel elektrofores olan ve kalanını globülin Fraksiyon V tozu içeren), 25 mg' lik ağırlıklar halinde tartıldı. Her bir tartı ardışık olarak aynı serum örneğine eklendi. Her bir eklemekten sonra bu örneğin T_1 ölçümleri alındı. İşlem 2 ml seruma ardarda eklenen albümin miktarı 1.7 gram oluncaya kadar sürdürüldü. Bu konsantrasyondan sonra örnek jelleştiği için deneyin devamı olanaklı olmadı.

T_1 ölçümleri 60MHz'de çalışan JEOL FT FX-60Q-NMR spektrometresi ve inversion-recovery puls adımı kullanılarak gerçekleştirildi. Puls aralığı 0.05 saniyeden 10 saniyeye dek değiştirildi. Puls tekrarlama süresi 20 saniye olarak alındı. Probe sıcaklığı JNM-VT-3C otomatik sıcaklık kontrol birimi kullanılarak, 20 ± 0.5 °C 'de sabit tutuldu. T_1 ölçümleri için deneysel hata ± 0.03 saniye mertebesinde idi.

Ölçümler sonucu elde edilen $1/T_1$ değerleri albümin kütlesi/su kütlesi (Ma/Ms) oranına karşı grafiklendi. Bulunan eğri, 4 ayrı doğru parçasına ayrıştırıldı (Cameron, Ord & Fullerton, 1988; Fullerton, Ord & Cameron, 1986). Bu ayrıştırma, her bir doğru parçası için en yüksek korelasyonu veren noktalar birleştirilerek ve en küçük kareler fiti kullanılarak yapıldı. Elde edilen doğru parçaları Şekil 1' de görülmektedir. Bu doğru parçalarının birleşim yerlerinden, proteinin çeşitli su tabakalarına ait durulma oranları ve proteinin gramı başına su miktarları saptandı (Cameron, Ord & Fullerton, 1988; Fullerton, Ord & Cameron, 1986).



Şekil 1. Serumdaki $1/T_1$ oranının Ma/Ms (Albümin kütlesi/Su kütlesi) üzerine bağıllığı.

Sonuçlar ve Tartışma

$1/T_1$ oranının Ma/Ms oranına karşı grafiklenmesi ile elde edilen doğru parçaları Şekil 1’ de görülmektedir. Şekillerden görüldüğü üzere, her bir doğru parçası için ilgi katsayısı 1’e yakındır. Veriler, başka dehidrasyon teknikleriyle elde edilen sonuçlar ile tutarlı görünüyor (Cameron, Ord & Fullerton, 1988).

Bir protein çözeltisindeki suyun, serbest, engellenmiş (düzenlenmiş veya yapılanmış), proteine dönerek bağlı ve dönmeden bağlı olmak üzere 4 ayrı fazda bulunduğu çeşitli çalışmalarda açıklanmıştır (Cameron, Ord & Fullerton, 1988; Fullerton, Ord & Cameron, 1986; Fullerton, 1988; Grösch & Noack, 1976). Su, bu fazlar arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş yapmakta ve $1/T_1$ oranı

$$\frac{1}{T_1} = \frac{f_s}{T_{1s}} + \frac{f_e}{T_{1e}} + \frac{f_{db}}{T_{1db}} + \frac{f_{dmb}}{T_{1dmb}} \quad (1)$$

bağıntısına uymaktadır (Zimmerman & Brittin, 1957). Burada s: serbest, e: engellenmiş, db: dönerek bağlı, dmb: dönmeden bağlı fazı ifade etmektedir. $1/T_1$ ’ ler ve f ’ ler ise ilgili fazlarda suyun durulma oranları ve bulunma olasılıkları göstermektedir.

Bir protein çözeltisindeki su buharlaştırılınca, önce serbest suyun, sonra engellenmiş suyun daha sonra da dönerek bağlı suyun ve en sonunda da dönmeden bağlı suyun buharlaştığı varsayılmıştır (Cameron, Ord & Fullerton, 1988; Fullerton, Ord & Cameron, 1986).

Bu çalışmada da ortama albümin ekleyerek, dıştan içe her bir tabakanın suyu tüketilmiştir. Serum durulma oranının ($1/T_1$) Ma/Ms’ ye karşı grafiklenmesi, ucuca ekli dört doğru parçası vermiş ve yukarıda sözü edilen dehidrasyon tekniği ile tutarlı sonuçlara yol açmıştır (Şekil 1). Her bir bölümün Şekil 1’ den elde edilen durulma oranı, proteinin gramı başına düşen su miktarı ve suyun bu bölümlerde bulunma olasılıkları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: Albümine ait su tabakaların spin-örgü durulma oranları ($1/T_1$), proteinin gramı başına düşen su miktarları (H₂O), suyun her bir fazda bulunma olasılığı(f) ve ilgi zamanları τ .

Su Tabakaları	1/T ₁ (1/sn)	gH ₂ O/gProtein	F	τ_c (s)
Serbest	0.59	4,71	0.72	1*10 ⁻¹²
Engellenmiş	0.95	1.5	0.23	5*10 ⁻¹⁰
Dönerek Bağlı	1.83	0.38	0.05	1.2*10 ⁻⁸
Dönmesiz Bağlı	3.82	0.05	0.008	1*10 ⁻⁷

Serbest fazdaki su moleküllerinin durulma mekanizmasının öteleme ve dönme hareketlerinden ileri geldiği bilinmektedir. Bu faz için ilgi zamanı 10⁻¹² s (Fullerton, 1988). Engellenmiş suyun durulma mekanizmasının, protein tarafından engellenen öteleme hareketinden ileri geldiği öne sürülmüştür (Grösch & Noack, 1976). Bloembergen, Purcell ve Pound (BPP) tarafından türetilen kurama göre bir dipol-dipol etkileşiminin 1/T₁ durulma oranına katkısı

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3\mu^2\gamma^2\eta^2}{160\pi^2r^6} \left[\frac{\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4\omega^2\tau_c^2} \right] \quad (2)$$

ifadesi ile verilir(Bloembergen, Purcell & Pound, 1948). 1/T₁= 0.95 s⁻¹, $\omega = 60$ MHz ve iki dipol arasındaki mesafe $r=2.7$ Å alınarak Denklem 2' den öteleme engellenmiş su için ilgi zamanı 5*10⁻¹⁰ s olarak hesaplanır. Bu fazın dönme ilgi zamanı 1*10⁻¹² s olarak hesaplanır ki burada asıl katkının gerçekten de ötelemeden ileri geldiğini doğruluyor (Grösch & Noack, 1976).

Dönerek proteine bağlanan suyun durulma mekanizması için kullanılan bağıntı,

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3\mu^2\gamma^2\eta^2}{160\pi^2r^6} \left[\frac{\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4\omega^2\tau_c^2} \right] \left(\frac{3\cos^2\alpha - 1}{2} \right)^2 \quad (3)$$

şeklindedir (Koenig & Schillinger, 1969; Marshall, Schmidt & Sykes, 1972). İfadedeki son çarpanın ortalama değeri 1/5 değerindedir (Hennel & Klinowsky, 1996). $r=1.2$ Å alınarak yapılan hesap dönerek bağlı su için ilgi zamanının 1.2*10⁻⁹s olarak verir.

Dönmeden proteine bağlı su için durulma mekanizmasına ait ilgi zamanı, proteinin takla hareketleri ile belirlenmiştir (Daszkiewicz, Hennel & Lubas, 1963). Bu durumda ilgi zamanı 10⁻⁷ s basamağında biliniyor (Kavak, 2000; Koenig & Schillinger, 1969).

$\omega^2\tau^2 \gg 1$ yaklaşımı altında Denklem 2;

$$\frac{1}{T_1} = (3\mu^2\gamma^2h^2 / 160\pi^2r^6) * \frac{2}{w^2\tau} \quad (4)$$

formuna indirgenir. R=1.52 A° alınarak yapılan hesaplar dönmesiz olarak bağlanan su için proteinin dönmesi ile elde edilen ilgi zamanı 10⁻⁷ s olarak tekrar doğrulanıyor.

Yukarıda hesaplanan ilgi zamanları ve proteine bağlı su miktarı da literatürle çok iyi uyum halindedir (Cameron, Ord & Fullerton, 1988; Fullerton, 1988; Gallier, Rivet & Certaines, 1987; Kavak, 2000). Bu nedenle de mevcut veriler, seruma protein ekleyerek yapılan dehidrasyon işlemini serum durulma mekanizmalarını açıklayıcı sonuçlara yol açtığını önermektedir.

Bu çalışma ile yapılan sonuçlar dört su tabakasının bulunması varsayımına dayanır. Ancak yakın yıllarda yapılan çalışmalarda, bu ilgi zamanları tabakalara değil de çeşitli su gruplarına atfedilmiştir (Balasubramanian, Bandyopadhyay, Pal & Bagchi, 2003; Bertini, Fragai, Luchinat. & Parigi, 2000; Bertini, Luchinat, Nerinovski, Parigi, Cross, Xiao & Wedd, 2003; Halle, 2004; Pouliquen, Gallois, 2001; Tarek & Tobias, 2000). Durumu ister tabaka modeli ister de farklı fazlarda bulunan su grupları olarak görelim, durulma zamanlarından ilgi zamanlarının türetimi benzer olmaktadır. Yorumlar biraz değişebilir.

Kaynaklar

- Balasubramanian, S., Bandyopadhyay, S. Pal, S. & Bagchi, B. (2003). Dynamics of water at the interface of a small protein, *enterotoxin*, *Current Science*, 85(11), 1571-1578.
- 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., Luchinat, C., Nerinovski, K., Parigi, G., Cross, M., Xiao, Z. & Wedd, A. G. (2003). Application of NMRD to hydration of rubredoxin and a variant containing a (Cys-S)₃Fe^{III}(OH) site, *Biophys. J.* 84, 545-551.
- Bloembergen, N., Purcell, E. M. & Pound, R. F. (1948). Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption *Phys.Rev.* 73, 679-712.
- Brooks, R. A. Battocletti, J. H. Sances, JR Larson, S. J. Bowman, L.R. & Kudravcev, V. (1975). Nuclear magnetic relaxation in blood. *IEEE Transac.Biomed, Engin.BME-22*(1), 12-16.
- 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.
- 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. (1988). Physiologic Basic of Magnetic Relaxation in Magnetic Resonance Imaging, David D. Stark & W. G. Bradley (Ed.)(ss. 36). St. Louis: The C.V. Mosby Company.
- Gallier, J., Rivet, P. & Certaines, 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.
- Hennel, J. W. & Klinowsky, J. (1996). Çekirdek Magnetik Rezonansın Temelleri. (Çev: S. Bahçeli). Ankara: Bizim Büro Basımevi (Özgün kitap 1993'da yayımlandı).
- Kavak, G. (2000). "Serum Proteinlerinin Spin-Örgü Durulma Mekanizmalarının NMR ile incelenmesi". Yayımlanmış doktora tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Koenig, S. H. & Schillinger, W. E. (1969). Nuclear magnetic relaxation dispersion in protein solutions, *J. Biol. Chem.* 244(23), 6520-6526.
- Koivula, A., Suominen, K., Timonen, T. & Kiviniitty, K. (1982). The spin-lattice relaxation time in the blood of healthy subjects and patients with malignant blood disease. *Phys.Med.Biol.*, 27(7), 937-947.
- Marshall, A. G., Schmidt, P. G. & Sykes, B.D. (1972). Effect of Internal Rotation on Nuclear Magnetic Relaxation Times for Macromolecules. *Biochemistry*, 11(21), 3875-3879.
- Pouliquen, D. & Gallois, Y. (2001). Physicochemical properties of structured water in human albumin and gammaglobulin solutions. *Biochimie*, 83, 891-898.
- Raeymaekers, H. H., Borghys, D. & Eisendrath, H. (1988). Determinants of water proton T_1 in blood serum. *Magn.Reson.Med.*, 6(2), 212-216.
- Tarek, M. & Tobias D. J. (2000). The dynamics of protein hydration water: A quantitative comparison of molecular dynamics simulations and neutron-scattering experiments. *Biophysical Journal*, 79, 3244-3257.
- Yılmaz, A., Ulak F. Ş. & Batun, M. S. 2004. Proton T_1 and T_2 relaxivities of serum proteins, *Magnetic Resonance Imaging*, 22(7), 683-688.
- Yılmaz, A. Chu, S. C. & Osmanoglu, S. (1988). Dependence of the solvent proton $1/T_1$ on the iron content in normal human serum. *Magn.Reson.Med.*, 7(6), 337-339.
- Yılmaz, A., Otludil, B., Batun, M. S., Ensari, Y., Longo, R. & Palma, L.D. (1992). Determination of iron and iron binding capacity by NMR. *Phys.Med.Biol.*, 37, 1589-1596.
- Yılmaz, A., Budak, H. & Longo, R. (1998). Paramagnetic contribution of serum iron to the spin-lattice relaxation rate ($1/T_1$) determined by MRI. *Applied Magnetic Resonance*, 14(1), 51-58.
- Zimmerman, J. R. & Brittin, W. E. (1957). Nuclear magnetic resonance studies in multiple phase systems: lifetime of a water molecule in an adsorbing phase on silica gel. *J.Phys. Chem.*, 61, 1328-1333.