

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**NMR DURULMA ORANI ARTIŞ FAKTÖRÜ($1/\epsilon^*$), İYON
KONSANTRASYONU VE BAĞLANMA SABİTLERİ(K_a, K_D)
ARASINDAKİ DENEYSEL İLİŞKİNİN KURAMSAL TÜRETİMİ**

Harun KOR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

(FİZİK ANABİLİM DALI)

DİYARBAKIR


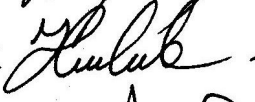

TEMMUZ-2005

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DIYARBAKIR

Harun KAR tarafından yapılan bu çalışma , jürimiz tarafından *Fizik*

Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>
Başkan: Prof. Dr.	Ali YILMAZ 
Üye : Yrd. Doç. Dr.	Hatice BUDAK 
Üye : Yrd. Doç. Dr.	Selahattin GÖNEN 

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

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

Doç. Dr. NECMETTİN PİRİNÇÇİOĞLU

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince, beni yönlendiren ve benden yardımlarını esirgemeyen, değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Hatice BUDAK ve Fizik Bölüm Başkanı Prof.Dr.Ali YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.Ayrıca tezimin yazma aşamasında bana yardımcı olan Öğr.Gör. Bülent BAŞARAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
AMAÇ:	iv
ÖZET:	v
SUMMARY:.....	vi
BÖLÜM 1	1
1.1. GİRİŞ	1
TEMEL NMR TEORİSİ.....	2
1.2. Elektronun ve Çekirdeğin Magnetik Momenti	2
1.3. Basit Rezonans Teorisi	2
1.4. Yalıtılmış Bir Çekirdeğin Magnetik Alandaki Hareketi ve Rezonans Olayının Oluşumu ...	4
1.5. Spin Durulması	6
1.6 T_1 Spin-Örgü Durulması	6
1.7 T_2 Spin-Spin Durulması	7
1.8 Paramagnetik Rölaksasyon	8
1.9 Proton Rölaksasyon Oranı Artışı(Enhancement) Teorisi	11
BÖLÜM 2	14
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	14
BÖLÜM 3	19
MATERYAL VE METOT	19
3.1 Makromolekül ile Küçük Molekülün Bağlanmasında Bağlanma Yerlerinin Grafikselleştirilmesi	19
3.2 Makromolekül ile Paramagnetik İyon Etkileşmesinin Magnetik Rezonans Çalışmalarından ϵ^* , K_a , K_d nin türetilmesi.....	23
BÖLÜM 4	26
BULGULAR.....	26
4.1 Protein ile İyon Titrasyonunda ($1/\epsilon^*$)'nin teorik olarak türetilmesi	26
4.2 İyon ile Protein Titrasyonunda $1/\epsilon^*$ nin teorik olarak türetilmesi.....	28
BÖLÜM 5	30
TARTIŞMA VE SONUÇ	30
KAYNAKLAR	31
SEMBOLLER.....	33
ÖZGEÇMİŞ	34

AMAÇ:

Bu çalışmanın amacı, Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) ve Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRI) çalışmalarında prob ve kontrast ajan olarak kullanılan paramagnetik iyonların, protein ve enzim ile bağlanması sonucu su protonlarının durulma oranında($1/T_1$) meydana gelen artış(enhancement) kuramı hakkında geniş bir bilgi elde etmektir.

Bir diğer amacımız, proton durulma artış kuramı kullanılarak, artış faktörü (ϵ^*) bağlanma sabitleri(K_a, K_d)'ni türetmektir. Ayrıca kullanılan metotları mukayese ederek bu alanda çalışacak araştırmacılara yol gösterici bir kaynak oluşturmaktır.

ÖZET:

Metal-protein ve metal-enzim komplekslerinde, proton durulma oranı artış faktörü ϵ^* kullanılarak yapılan çalışmalar araştırıldı. Bu çalışmalarda ϵ_b (bağlı iyonun durulma artış faktörü) ve K_a , K_D (bağlanma sabitleri) saptanmasında kullanılan metotlar incelendi. Birinci türde 1-1 bağlanma (bir proteine bir iyon) kabulü yapılarak ϵ_b , K_a ve K_D 'yi veren denklemler yeniden türetildi. ϵ^* ve Mn_t 'nin lineer ilişkisine yeni bir yaklaşım yapıldı. Bu çalışmanın dayandığı görüşlerden çıkardığımız sonuçlar, enhancement teorisinin protein ve enzime bağlanabilen paramagnetik metal iyonların geniş bir sınıfına uygulanabileceğini önermektedir.

SUMMARY:

The studies which had been done on metal-protein and metal enzyme complexes by using proton relaxation rate enhancement factor(ϵ^*) were investigated. The methods which had been used in those studies for determining ϵ_b (relaxation rate enhancement factor of bound ion), K_a and K_D (association constants) were examined. By assuming one to one binding(one protein to one ion) in the first kind, the equations giving ϵ_b , K_a and K_D were obtained again. A new to linear relation between ϵ^* and Mn_t were made. In the results we have inferred from opinions based on this study, it has been suggested that the theory of enhancement can be applied to a wide category of paramagnetic metal ions which can be bind to protein and enzyme.

BÖLÜM 1

1.1. GİRİŞ

Genel adıyla Magnetik Rezonans, magnetik momenti sıfırdan farklı olan maddelerle elektromagnetik enerjinin etkileşmesinden kaynaklanan bir tür rezonans olayıdır. Magnetik Rezonans, elektronun magnetik momenti ile mikrodalga enerjisinin etkileşmesi sonucu Elektron Paramagnetik Rezonans(EPR) ya da Elektron Spin Rezonans(ESR) ve çekirdek magnetik momenti ile radyofrekans enerjisinin etkileşmesi sonucu Nükleer Magnetik Rezonans(NMR) adıyla bilinir.

NMR tekniği,1945'te birbirinden bağımsız olarak Stanford'ta Bloch, Hansen ve Packard ve Harward'ta Purcell, Purrey ve Pound tarafından bulunmuştur. Başlangıçta sadece çekirdeklerin magnetik momentlerini saptamak için kullanılan NMR olayının kimyasal uygulamaları,1950'de bir magnetik alana konulan örnek tarafından soğurulan ışımının kesin frekansının çekirdeklerin kimyasal çevrelerine bağlı olduğu gösterildiği zaman başlamıştır.

Burada Rezonans deyimini dış bir etkenin, magnetik sistemin doğal frekansı ile uyum içinde olduğunu belirlemek üzere kullanılmaktadır. Doğal frekans, magnetik alan içindeki magnetik momentlerin Larmor dönü hareketinin frekansıdır. Dış etken de, Larmor dönü hareketi ile uyum içinde olacak şekilde bir frekansa sahip mikrodalga veya radyofrekans enerjisidir.

NMR'da sözü edilen magnetik moment sıfırdan farklı çekirdek spinleri ile uyuşan nükleer momenttir. Yani NMR çekirdek spinleri sıfırdan farklı olan çekirdekleri inceler. Rezonans yönteminin üstünlüğü, ilgilenilen örnekte bütünle karşılaştırıldığında çok zayıf olabilen bir katkıyı seçip ayırmayı mümkün kılmasıdır. En ilgi çekici örnek ise temel elektronik ferromagnetizmasına karşın demirin zayıf paramagnetizmasının gözlenmesidir. Bunların yanında rezonans, kesin, oldukça ayrıntılı ve başka yollarla elde edilemeyen tipte magnetik bilgi toplanmasını da mümkün kılar.

Günümüzde NMR kimyada(kristal yapısı, katalistler, polimerler, sıvı kristaller),biyolojide(uyuşturucuların etkisi, zarlar),fizikte(yoğun maddedeki molekül hareketi),tıpta(MR görüntüleme),jeolojide(madenler, kömür ve petrol kayaları) ve cam, betonlar ve seramik teknolojisinde geniş kapsamlı maddeler hakkındaki bilgimizi büyük ölçüde arttırmak için yoğun olarak kullanılmaktadır(2,4,16).

TEMEL NMR TEORİSİ

1.2. Elektronun ve Çekirdeğin Magnetik Momenti: ($\vec{\mu}$) Klasik anlamda magnetik moment bir akım ilmeğine karşılık gelir. Sistemi i akımı taşıyan S yüzeyli bir akım halkası gibi düşünersek,

$$\vec{\mu} = I\vec{S} \quad (1.1)$$

olur. Magnetik moment ($\vec{\mu}$) ile açısai momentum arasındaki bağıntı,

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{L} \quad (1.2)$$

şeklinde yazılabilir. Burada, γ Jiromagnetik oran

$$\gamma = \frac{-e}{2m_e} \quad (1.3)$$

dir. Kütlesi büyük olan parçacıklar küçük γ değerine sahip olur.

Elektron için türetilen, açısai momentum ile magnetik moment arasındaki oranlılık, çekirdeğin açısai momentumu \vec{L} 'ye ve çekirdeğin magnetik momenti $\vec{\mu}$ 'ye

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{L} \quad (1.4)$$

olacak biçimde uygulanabilir. Çekirdeğin açısai momentumu;

$$\vec{L} = \hbar\vec{I} \quad (1.5)$$

ifadesi ile verilir. Denklem (1.5) denklem (1.4) te yerine yazılırsa, magnetik moment,

$$\vec{\mu} = \gamma\hbar\vec{I} \quad (1.6)$$

olur.

1.3. Basit Rezonans Teorisi: Rezonans olayını anlatmak için basit bir kuantum mekaniksel sistem ele alalım. İzole edilmiş tek bir spinin (magnetik momenti $\vec{\mu}$) \vec{H} gibi statik bir

magnetik alan ile karşılıklı etkileşmesini düşünelim. \vec{H} magnetik alanın uygulanmasıyla ortaya çıkan etkileşme enerjisi

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}$$

$$E = -\mu H_0 \cos \theta \quad (1.7)$$

ifadesi ile verilir. Bu etkileşmenin basit kuantum mekaniksel Hamiltoniyen operatörü

$$\mathbf{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (1.8)$$

olur. Eğer \vec{H} alanı z – yönünde uygulanır ve denklem(1.6) denklem(1.8)' de yerine yazılırsa

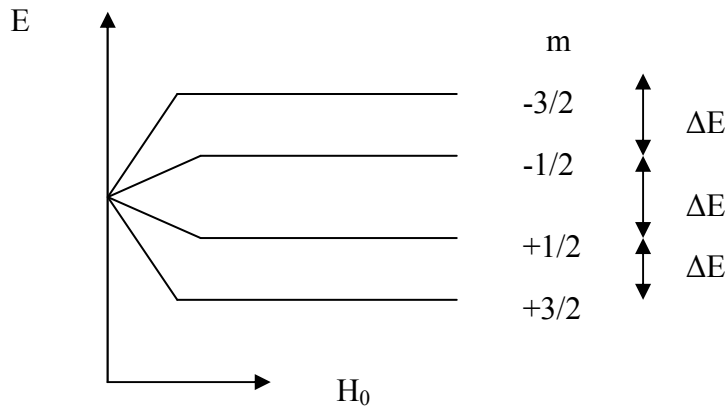
$$\mathbf{H} = -\gamma \hbar I_z H_0 \quad (1.9)$$

bulunur. Bu Hamiltoniyen operatörünün öz değerleri, I_z 'in öz değerlerinin ($\gamma \hbar H_0$) katlarıdır.

Buradan, sistem için mümkün olan enerji değerleri

$$E = -\gamma \hbar H_0 m \quad (m = I, I-1, \dots, -I) \quad (1.10)$$

dir. Spini 3/2 olan ^{11}B çekirdeğinin bir dış magnetik alandaki enerji düzeyleri şekil 1.1'de görülmektedir. Burada m 'nin alacağı değerler $2I+1$, yani dört tanedir; $m \rightarrow +3/2, +1/2, -1/2, -3/2$. Bu enerji seviyeleri arasındaki uzaklık $\gamma \hbar H_0$ dır ve hep eş aralıktır.



Şekil 1.1 Spini 3/2 olan ^{11}B çekirdeğinin bir dış magnetik alandaki Zeeman yarılmaları.

NMR'da uygun frekansta elektromagnetik enerji ile bu enerji düzeyleri arasındaki rezonans geçişleri oluşturulur. Sadece kesikli enerji düzeyleri arasındaki geçişler $\hbar \omega_0$ veya

bunun katları kadar kuantum enerjisinin soğurulması veya yayınlanmasına karşılık gelir. Genellikle sadece ardı ardına enerji düzeyleri arasında geçişler olur. Ardı ardına geçişlerle ilgili geçiş kuralı $\Delta m = \pm 1$ dir. Rezonans düzeyleri arasındaki,

$$\Delta E = \gamma \hbar H_0$$

enerji farkına eşit ω_0 frekansında radyo frekans ışınlanması yapılarak elde edilir. Bu durumda,

$$\hbar \omega_0 = \Delta E = -\gamma \hbar H_0 \quad (1.11)$$

eşitliğinden rezonans şartı,

$$|\omega_0| = \gamma H_0$$

elde edilir. Rezonans frekansı ile magnetik alan arasındaki bağıntıyı veren bu eşitlik NMR'ın temel eşitliğidir ve Larmor eşitliği olarak bilinir.

Görüldüğü gibi rezonans şartı sadece ilgili çekirdeğe ve alanın büyüklüğüne bağlıdır. Rezonans şartında, h Planck sabiti yer almadığı için bu sonuç klasik bir rezonans olayı olarak düşünülebilir.

1.4. Yalıtılmış Bir Çekirdeğin Magnetik Alandaki Hareketi ve Rezonans Olayının Oluşumu:

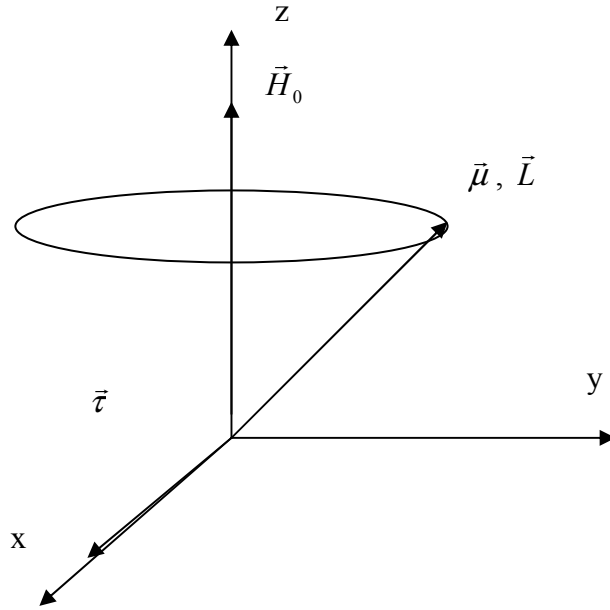
Rezonans olayının fiziksel özelliklerini anlamak için bir \vec{H}_0 magnetik alanındaki $\vec{\mu}$ magnetik momentini düşünelim. Magnetik moment,

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{H}_0 \quad (1.12)$$

ile verilen bir torkun etkisinde kalacaktır. Bu tork, momenti alan doğrultusunda yöneltmeye çalışır. Çekirdeğin spin hareketi ve açısal momentum ile tork arasındaki,

$$\left(\frac{d\vec{L}}{dt} \right) = \vec{\tau} \quad (1.13)$$

bağıntısından, sonuçtaki hareket basit bir yönelim değil, fakat çekirdek dönme ekseninin uygulanan alan etrafında dönmesi şeklindedir. Şekil 1.2’de görülen bu harekete presesyon denir.



Şekil 1.2 Bir $\vec{\mu}$ nükleer magnetik momentinin \vec{H}_0 alanı etrafındaki presesyon hareketi

Şimdi bir çekirdek spininin \vec{H}_0 ’a göre yönelimini değiştirmek için magnetik alan vektörü \vec{H}_0 ’a dik olan bir düzlemde dairesel olarak polarize olmuş bir \vec{H}_1 radyo frekans alanı uygulanır. Radyo frekans alanı da magnetik momente,

$$\vec{\tau}_1 = \vec{\mu} \times \vec{H}_1 \quad (1.14)$$

ile verilen bir tork uygulayacaktır. \vec{H}_1 alanı durgun ve şiddeti büyük ise bu alan \vec{H}_0 ’a ekleneceğinden net etki yine bileşke alan etrafında presesyon olacaktır. Bununla birlikte eğer \vec{H}_1 ’in büyüklüğü \vec{H}_0 ’dan çok daha büyük olacak şekilde seçilir ve \vec{H}_0 etrafında döndürülecek olursa ortaya çıkan tork, \vec{H}_1 alanının spin ile aynı açısal hız ve yönde döndüğü durum hariç, ihmal edilebilir olacaktır. Bu durumda, $\vec{\tau}_1$ sabit bir değere sahip olduğundan $\vec{\mu}$ dipolü, $\omega_1 = \gamma H_1 \ll \omega_0$ frekansında \vec{H}_1 etrafında presesyon hareketi yapar. \vec{H}_1 ’in sürekli olarak uygulanması ise \vec{H}_0 ile belirlenen enerji düzeyleri arasında geçişlere neden olur(18).

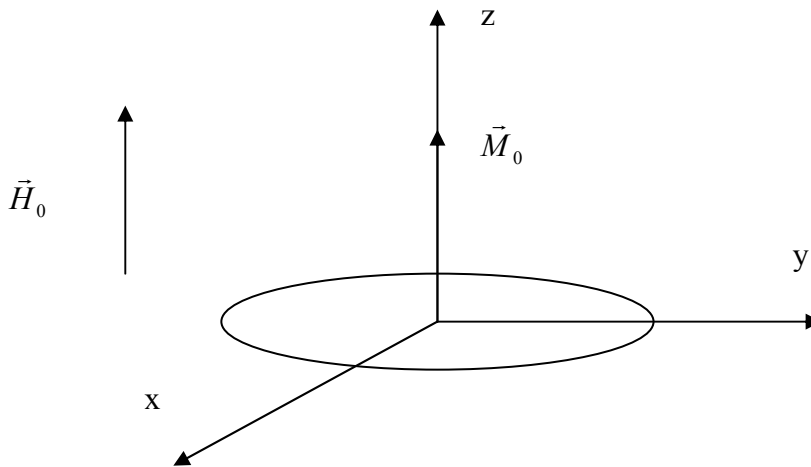
1.5. Spin Durulması

Elimizde bulunan bir örneği dış bir magnetik alana koyduğumuzda bir müddet sonra termal denge kurulacaktır. Spin sistemine rezonans frekansında alan uygulandığında enerji düzeyleri arasında geçişler oluşacağından Boltzmann dağılımı bozulur. Rezonansta başlangıçta yukarı doğru olan geçişler aşağı doğru olan geçişlerden fazla olduğundan bir müddet sonra her iki düzeydeki çekirdek sayısının eşit olmasını bekleriz. Bu durumda soğurulan net enerji sıfırdır ve magnetik rezonans geçişleri olduğu halde bunlar algılanmaz. Bu olay NMR'da doyma diye adlandırılır. NMR'ın gözlenebilmesi doymaya zıt yönde bir mekanizmaya bağlıdır. Durulma diye adlandırılan bu mekanizma spinlerin soğurdukları enerjiyi örgü diye adlandırılan çevreye aktararak yüksek enerjili anti-paralel, düşük enerjili paralel yönelime geçmelerini içerir.

Boltzmann dağılımının tekrar kurulması dönme ve titreşim enerji düzeylerinin durulmasına neden olan moleküler çarpışmalar gibi kısa sürede olmayıp zaman alır. Eğer ardı ardına NMR deneyleri yapıyorsak ve bu deneyler arasındaki tekrarlamaya zamanı çok kısa ise çekirdeklerin denge durumuna dönmesi için yeterli süre olmayacağından azalan spin sayısı farkı nedeniyle enerji soğurması dolayısıyla sinyal şiddeti düşük olacaktır(18).

1.6 T_1 Spin-Örgü Durulması

Dengede, net mıknatıslanma vektörü (\vec{M}_0), uygulanan magnetik alan \vec{H}_0 doğrultusundadır. Bu durumda, mıknatıslanmanın z bileşeni \vec{M}_z , \vec{M}_0 'a eşittir. \vec{M}_z boyuna mıknatıslanmadır. \vec{M}_x veya \vec{M}_y gibi enine mıknatıslanma oluşmaz.



Şekil 1.3 \vec{H}_0 alanın net mıknatıslanma vektörü \vec{M}_0 , z doğrultusunda oluşur.

Net mıknatıslanmayı, spin seviyeleri arasındaki enerji farkına eşit frekanslı bir enerji uygulayarak değiştirebiliriz. Eğer sisteme yeterli enerji verilirse, spin sistemi doyurulur ve $\vec{M}_z = 0$ olur. \vec{M}_z 'nin denge değerine dönmesini ifade eden zaman sabitine spin-örgü durulma zamanı (T_1) denir.

Bu davranışın denklemi t zamanının bir fonksiyonu olarak

$$\vec{M}_z = \vec{M}_0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad (1.15)$$

ile ifade edilir. Bunun için T_1 , mıknatıslanmanın z bileşenini e faktörü kadar değiştiren zaman olarak tanımlanır (M_0 / e).

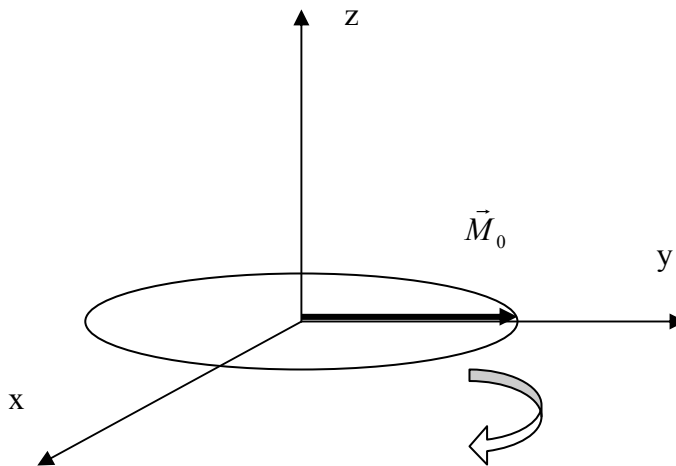
Eğer net mıknatıslanma $-z$ eksenine yerleştirilmişse, T_1 tarafından yönetilen bir oranda azalarak, $+z$ eksenine doğrultusundaki denge durumuna tekrar dönecektir. Bu hareketin denklemi

$$\vec{M}_z = \vec{M}_0 (1 - 2e^{-t/T_1}) \quad (1.16)$$

ile verilir. Bir başka deyimle spin-örgü durulma zamanı (T_1), herhangi bir andaki boyuna mıknatıslanma (\vec{M}_z) ve dengedeki mıknatıslanma arasındaki farkı e faktörü kadar azaltma zamanıdır (5).

1.7 T_2 Spin-Spin Durulması

Net mıknatıslanma, y eksenine boyunca xy düzlemine yerleştirilmişse, z eksenine etrafında spinin iki enerji düzeyi arasındaki geçişe neden olan Larmor frekansı ile dönecektir.



Şekil 1.4 Net mıknatıslanmanın y ekseninde oluşması ve z eksenine etrafındaki presesyon hareketi

Dönmeye ek olarak net mıknatıslanma faz bozulumu göstermeye başlar. Çünkü spin paketlerinden her biri farklı magnetik alan oluşturur ve bu alanın Larmor frekansı ile dönerler. Zaman geçtikçe daha büyük faz farklılıkları oluşur. Enine mıknatıslanmanın (M_{XY}) denge durumuna dönmesini ifade eden zaman sabiti spin-spin durulma zamanı (T_2) olarak adlandırılır.

$$M_{XY} = M_{X_0Y_0} e^{-t/T_2} \quad (1.17)$$

denklemlerle ifade edilir. T_2 her zaman T_1 'den küçük veya eşittir. xy düzlemindeki net mıknatıslanma sifira giderken, z doğrultusundaki boyuna mıknatıslanma tekrar oluşur. T_2 enine mıknatıslanmayı e faktörü kadar azaltan zamandır (M_{XY}/e). İki faktör enine mıknatıslanmanın bozunumuna etki eder: Bunlar, moleküler etkileşimler ve \vec{H}_0 'daki homojensizliktir. Bu iki faktörün birleşimi, enine mıknatıslanmanın bozunumu ile sonuçlanır. Toplam zaman sabiti T_2^* ile gösterilirse, bu iki faktörün etkisini belirtmek üzere aşağıdaki denklem yazılır(5).

$$1/T_2^* = 1/T_2 + 1/T_{2in-hom-o}. \quad (1.18)$$

1.8 Paramagnetik Rölaksasyon

Paramagnetik iyonun elektron spini \vec{S} ile suyun çekirdek spini \vec{I} 'nin dipolar etkileşmesi, spin-örgü rölaksasyon zamanına katkıda bulunurlar.

Çekirdek ve elektron momentleri $\vec{\mu}_\zeta$ ve $\vec{\mu}_e$ etkileşmelerinin Hamiltoniyeni

$$H_d = \frac{\vec{\mu}_e \cdot \vec{\mu}_\zeta}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_e \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_\zeta \cdot \vec{r})}{r^5} \quad (1.19)$$

şeklinde olan bir çift magnetik iki kutuplunun etkileşmesidir.

$$\begin{aligned} \vec{\mu}_\zeta &= \gamma \hbar \vec{I} \\ \vec{\mu}_e &= \gamma' \hbar \vec{S} \end{aligned} \quad (1.20)$$

Bağıntılarından

$$H_d = \frac{\hbar^2 \gamma \gamma'}{r^3} \left[\bar{\mathbf{I}} \cdot \bar{\mathbf{S}} - 3 \frac{(\bar{\mathbf{I}} \cdot \bar{\mathbf{r}})(\bar{\mathbf{S}} \cdot \bar{\mathbf{r}})}{r^2} \right] \quad (1.21)$$

operatör formda yazabilmek için $H_1(t)$ rasgele Hamiltoniyeni,

$$H_1(t) = \sum_q F^{(q)}(t) A^{(q)} \quad (1.22)$$

şeklinde yazılabilir. $F^{(q)}(t)$ zamanın rasgele fonksiyonları olarak $A^{(q)}$ 'lar da spin operatörlerini gösterir. Dönen sistemde $A^{(q)}$ 'lar

$$e^{iH_0 t} A e^{-iH_0 t} = A^{(q)}(t) = \sum_p A_p^{(q)} e^{i w_p^{(q)} t} \quad (1.23)$$

şeklinde zamana bağlı olurlar. $H_1(t)$ de dönen sistemde

$$H_1^*(t) = e^{iH_0 t} H_1(t) e^{-iH_0 t} = \sum_{pq} F^{(q)} A_p^{(q)} e^{i w_p^{(q)} t} \quad (1.24)$$

olur. Buna göre denklem (1.22)'nin örgü ve spin ile ilgili kısımlarını ayırırsak,

$$F^{(1)} = \frac{\sin \theta \cos \theta e^{-i\theta}}{r^3}, \quad F^{(2)} = \frac{\sin^2 \theta e^{-2i\theta}}{r^3}, \quad F^{(3)} = \frac{1 - 3 \sin^2 \theta}{r^3} \quad (1.25)$$

$$A^{(0)} = \alpha \left\{ -\frac{2}{3} \mathbf{I}_Z S_Z + \frac{1}{6} (\mathbf{I}_+ S_- + \mathbf{I}_- S_+) \right\}$$

$$A^{(1)} = \alpha \{ \mathbf{I}_Z S_+ + \mathbf{I}_+ S_Z \} \quad (1.26)$$

$$A^{(2)} = \frac{1}{2} \alpha \mathbf{I}_+ S_+, \quad \alpha = -\frac{3}{2} \gamma_1 \gamma_S \hbar$$

elde ederiz. Esas Hamiltoniyen

$$H_0 = w_1 \mathbf{I}_Z + w_S S_Z \quad (1.27)$$

ile verilir. Buna göre dönen sistemde $A(q)$ 'lar aşağıdaki şekilde yazılırlar.

$$e^{iH_0 t} A^{(0)} e^{-iH_0 t} = -\frac{2}{3} \alpha \mathbf{I}_S S_Z + \frac{1}{6} \alpha \mathbf{I}_+ S_- e^{i(w_1 - w_s)t} + \frac{1}{6} \mathbf{I}_- S_+ e^{i(w_1 - w_s)t}$$

(1.28)

$$e^{iH_0 t} A^{(2)} e^{-iH_0 t} = \alpha [\mathbf{I}_+ S_Z e^{i w_1 t} + \mathbf{I}_+ S_Z e^{i w_s t}]$$

$$e^{iH_0 t} A^{(2)} e^{-iH_0 t} = \frac{1}{2} \alpha \mathbf{I}_+ S_+ e^{i(w_1 + w_s)t}$$

Makroskopik örnek üzerinde gerçekleştirilen bir deneyde M mıknatıslanmanın ölçülen değerinin zamanla değişimi olan,

$$\frac{d \langle M \rangle^*}{dt} = -\{ \langle A \rangle^* - \langle A \rangle_0 \} \quad (1.29)$$

röleksasyon denklemini elde ederiz.

$$A = \frac{1}{2} \sum_q J_q(w_p^{(q)}) \{ A_p^{(q)}, (A_p^{(-q)}, M) \}$$

$J_q(w_p^{(q)})$ spektral yoğunluk ise;

$$J_q(w_p^{(q)}) = \int_{-\infty}^{\infty} \overline{F^{(q)}(t) F^{(q)}(t + \tau)} e^{-i w_p^{(q)} \tau} d\tau \quad (1.30)$$

olarak verilir. Denklem (1.29)' da yerine koyar ve $M_Z = \langle \mathbf{I}_Z \rangle$ ifadesini yazarsak,

$$\frac{d \langle \mathbf{I}_z \rangle}{dt} = -\frac{1}{T_1^{\text{II}}} (\langle \mathbf{I}_z \rangle - \mathbf{I}_0) - \frac{1}{T_1^{\text{IS}}} (\langle S_z \rangle - S_0) \quad (1.31)$$

$$\frac{d \langle \mathbf{I}_z \rangle}{dt} = -\frac{1}{T_1^{\text{SI}}} (\langle \mathbf{I}_z \rangle - \mathbf{I}_0) - \frac{1}{T_1^{\text{SS}}} (\langle S_z \rangle - S_0)$$

I ve S indislerini değiştirerek T_1^{SS} ve T_1^{SI} için benzer eşitlikler elde edilebilir.

$$\frac{1}{T_1^{\text{II}}} = \gamma_1^2 \gamma_s^2 \hbar^2 S(S+1) \left\{ \frac{1}{12} J^{(0)}(w_1 - w_s) + \frac{3}{2} J^{(1)}(w_1) + \frac{3}{4} J^{(2)}(w_1 + w_s) \right\}$$

Bu eşitlikler kullanılarak, çiftlenmemiş bir elektron tarafından bir çekirdeğin rölaksasyonunu tanımlayan denklem,

$$\frac{1}{T_1^{\text{II}}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_1^2 g^2 S(S+1)}{r^6} \left(\frac{3\tau_c}{1+w_1^2 \tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1+w_s \tau_c^2} \right) \quad (1.32)$$

olarak bulunur. Burada r çekirdek ve elektron(veya iyon) arasındaki mesafedir. w_s ve w_1 elektron ve çekirdeğin larmor frekanslarıdır. τ_c dipolar etkileşmenin dalgalanması için uygun korelasyon katsayısıdır. $T_1^{\text{II}} = T_1$ yazar ve $w_s \gg w_1$ ve $w_1 \tau_c^2 \ll 1$ olduğunu kullanırsak

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{15} \frac{\gamma^2 g^2 S(S+1)}{r^6} \left(3\tau_c + \frac{7\tau_c}{1+w_s^2 \tau_c^2} \right) \quad (1.33)$$

elde edilir. Bir çekirdek spini etrafındaki n tane spin ile etkileşiyorsa toplam rölaksasyon,

$$\frac{1}{T_1} = \sum_i^n \frac{1}{T_{1i}} = \frac{n}{T_{1i}} \text{ den bulunur. (1,10)} \quad (1.34)$$

1.9 Proton Rölaksasyon Oranı Artışı(Enhancement) Teorisi

Paramagnetik iyonlar makro moleküle bağlı iken, paramagnetik iyonların su protonlarının rölaksasyon oranına etkisi(enhancement) ilk defa DNA ile **Eisinger(1961)** ve proteinlerle **Cohn ve Leigh(1962)** tarafından araştırılmıştır. Bu artış, hidrasyon küresinin bağıl rotasyonel hareketinin bir sınırlanmasına ve paramagnetik iyon makro molekülün dış kısmına bağlı iken paramagnetik iyonun elektron spini ve hidrasyon küresindeki çekirdek spini arasındaki magnetik etkileşmelerin rotasyonel korelasyon zamanındaki doğal bir artışa atfedilmiştir.

Saf su için üç saniye civarında olan spin-örgü rölaksasyon zamanının(T_1), proton-proton dipolar magnetik rölaksasyon oranını gösterdiği iyi bilinmektedir. Paramagnetik iyonlar çözeltiliye

eklendiğinde, proton rölaksasyon oranı, iyonların elektronik momentleri ve proton momentleri arasındaki magnetik etkileşimler tarafından yönetilir. Bunun nedeni, protonların ve iyonların bağıl hareketlerinden dolayı, protonların, frekans spektrumu proton Larmor frekansı içeren değişken bir magnetik alana maruz kalmasıdır. Suyun rölaksasyon oranına en büyük katkı, iyonların hidrasyon küresi içindeki protondan gelir. Proton rölaksasyon oranının($\frac{1}{T_1}$) iki kısımdan oluştuğu kayda değer bir miktar deneysel ve teorik çalışmayla belirlenmiştir. Bunlardan birincisi proton-elektron magnetik dipolar etkileşimden, ikincisi izotropik hyperfine etkileşiminden ortaya çıkar.

Dipolar etkileşim için korelasyon zamanı(τ_c),

$$\tau_c^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_s^{-1} + \tau_h^{-1} \quad (1.35)$$

ile verilir. Burada τ_r , hidrasyon küresi rotasyonel korelasyon zamanı, τ_s elektron spin rölaksasyon zamanı ve τ_h iyonun hidrasyon küresindeki ömrüdür. Hyperfine etkileşimi hidrasyon küresinin rotasyonel hareketinden etkilenmediği için onun rotasyonel korelasyon zamanı

$$\tau_e^{-1} = \tau_s^{-1} + \tau_h^{-1} \quad (1.36)$$

ile verilir. Yüksek alan bölgelerinde($w_s^2 \tau_c^2, w_s^2 \tau_e^2, \gg 1$) dipolar ve hyperfine etkileşimleri sırasıyla τ_c ve τ_e ile orantılıdır(w_s , elektron Larmor frekansı).

Tartışmamızı yüksek alan bölgelerinde Mn^{2+} iyonlarına odaklaştırarak devam ettirecek olursak; Mn^{2+} için

$$\tau_r \ll \tau_s < \tau_h$$

olduğu görülür. Bu nedenle sadece dipolar kısmın proton rölaksasyon oranına önemli bir katkısının olduğu söylenebilir ve

$$(1/T_1) \propto n_h \tau_c \approx n_h \tau_r$$

yazılabilir. Burada n , hidrasyon küresindeki proton sayısıdır.

Şimdi sulu Mn^{2+} çözeltisi içinde makro moleküllerin varlığının etkilerini incelemeye çalışalım. Eğer iyonlar ve moleküller arasında etkileşim yoksa T_1 ' in değeri sulu Mn çözeltisinde değişmez kalacaktır. Eğer iyon herhangi bir şekilde moleküle bağlanırsa en yakın komşu su molekülleri sayısı ve dolayısıyla n_h ve $1/T_1$ azalacaktır. Son olarak eğer iyon molekülün dış yüzeyine bir yere bağlanırsa n_h ' in değeri çok fazla düşmeyecek fakat hidrasyon küresindeki suların rotasyonel hareketi bir ya da iki serbestlik derecesi kaybedecektir. Sonuç olarak τ_c ($\approx \tau_r$) uzamış olacak ve rölaksasyon oranı artmış olacaktır. Paramagnetik iyonlardan dolayı meydana gelen proton rölaksasyon oranını karakterize etmenin uygun bir yolu paramagnetik proton rölaksasyon oranı artış faktörü parametresini tanımlamaktır.

$$\varepsilon = R^* / R \quad (1.37)$$

Burada R^* makro molekül varlığındaki ve R makro molekül yokluğundaki proton rölaksasyon oranlarıdır.

Gözlenen proton rölaksasyon oranı artış faktörü değerleri, bağlanma yerlerinin sayısını, bağlanma ve ayrılma sabitlerini belirlemede kullanılmaktadır. Bu nedenle proton rölaksasyon oranı artış faktörü, moleküler biyolojide iyon bağlanmasının etkili olduğu değişik problemlerde(DNA-metal sistemleri ve enzim reaksiyonları) ve paramagnetik iyonların biyolojik olarak önemli moleküllerin parçaları olduğu yerlerde(Ceruloplasmin) etkili bir araç olarak kullanılabilir. Örneğin bir taraftan DNA moleküllerinin öbür taraftan ribonükleotidlerin birkaç metal iyonu ile aralarındaki bağlanma özelliklerini ve bağlanma mertebelerini belirlemek mümkündür(11).

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

JACQUES REUBEN(15) yaptığı çalışmada Gadolinium'un(Gd) bir paramagnetik probe olarak kullanılması ile biyolojik makro moleküllere metal iyonlarının bağlanmasını çalışarak, proton rölaksasyon metotlarının bir araştırmasını yapmıştır. Makro molekül olarak **Bovine Serum Albümin**'i(BSA) seçmiştir. Suyun proton rölaksasyon oranının uzunluğunun, paramagnetik Gd(III)-BSA çözeltisindeki iyon konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını söylemiştir. Enhancementı aşağıdaki şekilde tanımlayıp

$$\epsilon^* = \frac{1/T_{1p}^*}{1/T_{1p}} \quad (2.1)$$

analitik bir parametre olarak kullanarak

$$\epsilon^* = \frac{M_f}{M_t} \epsilon_f + \frac{M_b}{M_t} \epsilon_b \quad (2.2)$$

bağıntısından ϵ_b 'yi tanımlayıp BSA'nın Gd(III) için dört tane bağlanma yeri olduğunu bulmuştur. Bağlanma sabitini 300 ^0K ' de $1,3 \times 10^{-4}$ M olarak ölçmüştür. Burada T_{1p}^* protein varlığındaki ve T_{1p} protein yokluğundaki rölaksasyon zamanlarıdır. M_f serbest metal konsantrasyonu M_b bağlı metal konsantrasyonu olup ϵ_b bağlı formdakilerin proton rölaksasyon oranı artışı, ϵ_f serbest formdakilerin proton rölaksasyon oranı artışıdır. Ayrıca değişik frekans ve sıcaklık değerlerinde alınan ölçümlerden proton rölaksasyon oranı artış mekanizmasını tartışmıştır. Cocodylate-Gd(III) çözeltisinde elektron-çekirdek dipolar etkileşiminin korelasyon zamanının Gd(III)-BSA çözeltisinde elektron spin rölaksasyon zamanının değiştiğini gözlemiştir.

G.NAVON'un(12) yaptığı çalışmada carboxypeptidase A ve pyruvate kinase içeren manganlı bir sulu çözeltide, proton rölaksasyon zamanının frekansa bağlılığı ölçülmüş ve analiz edilmiştir. Elektron spin rölaksasyon zamanının uzunluğu frekansa bağlı bulunmuştur ve düşük frekanslarda proton rölaksasyon zamanlarını kontrol ettiği belirlenmiştir. Proton rölaksasyon oranı artış faktörü kullanılarak bağlı manganın koordinasyon küresindeki değişebilir su molekülleri sayısı,

carboxypeptidase A için 1, pyruvate kinase için 2 olacağı bulunmuştur. Böylece paramagnetik metal iyonların enzimlerin aktif bağlanma yerlerinin incelenmesinde önemli olduğu vurgulanmıştır.

A.R.PEACOCKE ve arkadaşları(14) E.coli ribozomal RNA ve Mn^{2+} iyonları içeren bir sulu çözeltide bir dizi magnetik alan ve sıcaklık değerlerinde, su protonlarının spin rölaksasyonunu içeren bir çalışma yapmışlardır. Proton rölaksasyon oranı artış teorisini kullanıp bağlanma sabitini ve bağlanma yeri sayısını hesaplamışlardır. Paramagnetik iyonların etkisi RNA varlığında arttırılmıştır. Sıcaklık düşürüldüğünde, büyüklüğü alana bağlı olan T_1 'in minimum bir değer aldığı gözlenmiştir. Bu, sulu çözeltinin hareketinden elektron spin rölaksasyonuna kadar dipolar rölaksasyon mekanizması içindeki bir değişime bağlanmıştır..

YANG S. KANG ve arkadaşları(8) proton NMR görüntüleme için kontrast madde olarak kullanılan paramagnetik iyonların etkilerini değiştiren bazı faktörleri çalışmışlardır. İyon içeren sulu bir çözeltinin rölaksasyon oranının magnetik momentle güvenilir bir şekilde tahmin edilemeyeceği gösterilmiştir. Proton rölaksasyon oranı artış faktörü kullanılarak bağlanma yerleri sayısı ve bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. İyonlar büyük moleküllerle kompleks halindeyken, dominant korelasyon zamanı ile artan proton rölaksasyon oranı artış faktörünün güvenilir sonuçlar verebileceği gösterilmiştir. Proton rölaksasyon oranı artış faktörünün sırasıyla pH ve bağlanma rekabeti gibi bazı faktörlerle değişebileceği belirtilmiştir. Mangan için, metal bağlanma derecesini hesaplamakta hassas olan (T_1/T_2) 'nin yararlı bir parametre olduğu belirlenmiştir. Paramagnetik rölaksasyon enhacementının biyolojik dokudaki özellikleri, kan içinde var olan maddeler ve mangan kullanılarak bir dizi deneyde gösterilmiştir.

ALBERT S. MİLDVAN VE MİLDRED COHN(11) yaptıkları çalışmada, bağlı manganın, su protonlarının nükleer magnetik rölaksasyon oranı $(1/T_1)$ uzunluğuna etkisinin yeni bir fiziksel parametresini NMR pulsu ile ölçmüşlerdir. Bu parametrelerin değerleri, bağlı manganın proton rölaksasyon oranının aynı konsantrasyondaki serbest manganinkine oranı olan ϵ_b (enhancement) teriminde ifade edilmiştir. Böylece gözlenen proton rölaksasyon oranı artış değerleri, bağlanma yerlerinin sayısını tayin etmede ve **bovine serum albümin**'e Mn^{2+} 'nin bağlanma sabitini belirlemede kullanılmıştır. Ayrıca proteindeki yapısal değişimin sebebi ile ϵ_b 'de meydana gelen değişimi anlatmak için proton rölaksasyon oranı artış değerleri kullanılmıştır. Elektron

Spin Rezonans kullanılarak serbest Mn^{2+} nin ölçümlerinden tayin edilen bağlanma yerleri sayıları ve bağlanma sabitleri, proton rölaksasyon oranı artış faktöründen tayin edilen bağlı Mn^{2+} değerleri ile iyi şekilde uyum içinde olduğu gözlenmiştir.

ROBERT JONES ve arkadaşları(7) yaptıkları çalışmada puls NMR tekniklerini kullanarak, serbest Gd(III) iyonları ve Lysozyme içeren Gd(III) çözeltilerinde bir dizi sıcaklık değerlerinde(0-40 °C) su proton rölaksasyon zamanlarını (T_1, T_2) ölçmüşlerdir. Ayrıca Lysozyme ve Gd(III) arasındaki dengeyi sıcaklığın bir fonksiyonu olarak çalışmışlardır. Su rölaksasyon oranları, grafik ve hesaplama tekniklerinin bir kombinasyonu kullanılarak hem serbest hem de enzim bağlı metal bağlanma yerleri içinde belirlenmiş ve var olan teorilere hemen hemen uymuştur. Su koordinasyon küresi sayısı(q) ve dipolar rölaksasyon süreçleri için korelasyon zamanı(τ_c) elde edilmiştir ve bu süreçlerin τ_c 'ye katkıları sıcaklık ve frekansın bir fonksiyonu olarak analiz edilmiştir. Enzim kompleksinde τ_c için elde edilen sonuçlar daha önceki bazı tahminlerden kayda değer bir şekilde farklı çıkmıştır. Sulu iyon çözeltisinde rölaksasyonun, rotasyonel korelasyon zamanı(τ_r) tarafından kontrol edildiği belirtilmiştir. Fakat enzim-metal çözeltilerinde elektron spin rölaksasyon zamanının(τ_s) düşük frekanslarda diğer süreçlerden daha önemli olduğu vurgulanmıştır. Magnetik Rezonans teknikleri kullanılarak Lysozyme ve diğer makro moleküllerin yapılarını analiz etmek için elde edilen bu sonuçların uygulamaları çalışılmıştır.

Bu sonuçların bağlanma yerleri ile ilgili çalışmalarında proton rölaksasyon oranı artış faktörü kullanılmıştır. Aşağıdaki formüller kullanılıp

$$\epsilon^* = \frac{1/T_{1p}^*}{1/T_{1p}} \quad (2.8)$$

$$K_D = \frac{[M]_f \cdot [E]_f}{[ME]} \quad (2.9)$$

proton rölaksasyon oranı artış faktörü ile ayrılma sabiti arasında

$$\frac{1}{\varepsilon^* - 1} = \frac{1}{[E]_t} \frac{K_D}{(\varepsilon_b - 1)} + \frac{1}{\varepsilon_b - 1} \quad (2.10)$$

ifadesi elde edilmiştir. Burada, $[E]_f$ serbest enzim konsantrasyonu, $[M]_f$ serbest metal konsantrasyonu, $[E]_t$ toplam enzim konsantrasyonu, K_D ayrılma sabitidir.

A.DEAN SHERRY ve arkadaşları(17) yaptıkları çalışmada ($H_2O - D_2O$) karışımında su protonları rölaksasyon zamanının uzunluğunu belirlemek için direk bir metot kullanmışlardır. Saf suyun rölaksasyon zamanının (2.7 sn) %10 H_2O -% 90 D_2O çözeltisinde 9 sn ye arttığı gözlenmiştir. Bu daha uzun rölaksasyon zamanı, paramagnetik metal iyonlarından kaynaklanan proton rölaksasyon oranı artış faktörünün belirlenmesi için kullanılmıştır. Mangan iyonunun Bovine Serum Albümin'e bağlanması durumundaki parametreler, daha önce konuda geçen ve A.S MİLDVAN ve MİLDRED COHN tarafından kullanılan yöntemlerle belirlenmiştir.

BRUCE G. JENKINS ve arkadaşları(6) tarafından yapılan bu çalışmada proton rölaksasyon oranı artış faktörünün çözelti protonlarına etkisini kullanılarak, potansiyel kan hücrelerinin ve hepatobiliary paramagnetik demir(III) kontrast ajanlarının, rac- ve meso- $Fe(5-Br-EHPG)^-$ (demir(III) N,N' -ethylenebis[(5-bromo-2-hydroxyphenyl)glycinate]) ve $Fe(5-Br-HBED)^-$ (demi(III) N,N' -bis-(5 bromo-2-hydroxybenzyl) ethylenediaminediacetic acid), Human Serum Albümin'e (HSA) bağlanması çalışılmıştır. Bu şelatların HSA'ya değişik yerlerde, farklı değerlere sahip bağlanma sabitleriyle sıkıca bağlandığı gözlenmiştir. Su proton rölaksasyon oranları paramagnetik bileşenlerinin beklenen proton rölaksasyon oranı artışı, protein bağlı kontrast ajanların rotasyonel korelasyon zamanındaki artıştan meydana gelirken, HSA'dan dolayı su rölaksasyonunun diamagnetik bileşenleri içinde bağlanma sonuçları ilginç bir şekilde azalma içinde olduğu gözlenmiştir. Bu proton rölaksasyon oranı artışlarının şelatların proteinlere nereden ve nasıl bağlandığına bağlı olarak değişebildiği gözlenmiştir. Sıcaklığın değişmesi, şelatların yakınlığına bağlı olarak birinci ve ikinci türden bağlanma yerleri olduğu sonucunu vermiştir.

HATİCE BUDAK'm(3) yaptığı çalışmada artan Mn^{2+} konsantrasyonuna karşı, kan serumu ve kan serumu proteinleri(albümin, γ -globülin,($\alpha + \beta$)-globülin) içeren çözeltilerde NMR T_1 değerleri ölçülmüştür. Farklı mangan konsantrasyonlarından kaynaklanan proton rölaksasyon oran artışı(ϵ^*) her çözelti için belirlenmiştir. Bağlı manganın proton rölaksasyon artış oranı(ϵ_b) albümin, γ -globülin, ($\alpha + \beta$)-globülin ve kan serumu için sırasıyla 13.601, 3.115, 8.584, 10.869 bulunmuştur. Bulunan bu sonuçlar kullanılarak kan serumuna ve γ -globüline Mn^{2+} 'nin bağlanma sabitleri sırasıyla $1.98 \times 10^4 M^{-1}$ ve $2.35 \times 10^4 M^{-1}$ hesaplanmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada 1961 yılından 2005'e kadar iyon-protein bağlanmalarında proton durulma artış oranıyla ilgili yayınlanmış makaleler araştırıldı. Bu makalelerde bağlanmalardan elde edilen verilerin grafiksel ifadesinden ϵ_b, K_a, K_D 'nin türetilmesiyle ilgili metotlar incelendi. Aşağıda iki başlık altında verilen bu incelemeler çalışmamızın materyalini oluşturdu.

3.1 Makromolekül ile Küçük Molekülün Bağlanmasında

Bağlanma Yerlerinin Grafiksel İncelenmesi

Birçok etkileşimde ilk moleküler adım, bir makro molekül(protein, enzim gibi) ile bir veya birçok küçük molekülün(ligant, substrat gibi) birleşimidir.

Bu tür etkileşimlerde en önemli faktör protein ve substrat konsantrasyonlarıdır. Substrat konsantrasyonundaki değişimler yoluyla reaksiyonun kinetik mekanizması bulunabilir. Bazı kinetik sabitler bulunarak substratların hücre içi konsantrasyonları ölçülebilir.

En basit enzim katalizli sistem tek bir substratın tek bir ürüne dönüştüğü reaksiyonlardır.

Reaksiyon şeması;



şeklinde yazılır. Burada ES enzim-substrat ve EP enzim-ürün kompleksleridir. Sadece bir kompleksin olduğu(ES) geri reaksiyonların önemsiz olduğu şartlarda reaksiyon şeması



şeklini alır. Böylece reaksiyon hızı türetilir.

Henry-Michaelis-Menten yaklaşımında; E, S ve ES'nin çok hızlı olarak dengeye ulaştığı ve ES'nin ürüne dönüşümünün çok yavaş olduğu kabul edilir($kp \ll k_{-1}$). Herhangi bir andaki hız ES konsantrasyonuna bağlıdır ve toplam enzim E ve ES arasında dağılır.

$$V = kp|ES| \quad (3.3)$$

ve

$$|E|_t = |E| + |ES| \quad (3.4)$$

yazılabilir. (3.3) eşitliğinde kp katalitik hız sabitidir. (3.3) ve (3.4) eşitlikleri oranından

$$\frac{V}{|E|_t} = \frac{kp|ES|}{|E| + |ES|} \quad (3.5)$$

denklemini elde edilir. Dissosiyasyon dengesinden bulunan $|ES|$ değeri denklem (3.5) te yerine yazıldığında

$$\frac{V}{kp|E|_t} = \frac{|S|}{1 + \frac{|S|}{k_s}} \quad (3.6)$$

elde edilir. Enzimin tümünün ES kompleksi şeklinde bulunması halinde maksimum hıza ulaşacağından $kp|E|_t = V_{\max}$ yazılabilir. O halde sonuç olarak

$$V = \frac{V_{\max}|S|}{k_s + |S|} \quad (3.7)$$

eşitliği elde edilir. Burada V tepkimenin başlangıçtaki hızı, V_{\max} madde sonsuz konsantrasyona yaklaşırken maksimumun başlangıç hızıdır. k_s Michaelis sabiti (dissociation reaksiyonlarını tanımlar) ve S substrat konsantrasyonudur.

Ayrıca

$$k_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{|E||S|}{|ES|} \quad (3.8)$$

dissosiyasyon dengesinde bulunan E 'değeri denk(3.4)'te yerine yazıldığında

$$\frac{|ES|}{|E|_t} = \frac{nkp|S|}{1+kp|S|} \quad (3.9)$$

denge ile ilgili eşitlik elde edilir. $\frac{|ES|}{|E|_t} = r$, $kp = k$ ve $|S| = A$ kısaltmaları yapılarak denk(3.9)

$$r = \frac{nkA}{1+kA} \quad (3.10)$$

şeklinde yeniden düzenlenebilir. Burada r makro molekül başına bağlı küçük molekülün molekül ağırlığı, n makro moleküle bağlı küçük molekülün bağlanma yeri sayısı, k bağlanma sabiti ve A bağlı olmayan küçük moleküllerin molar konsantrasyonudur.

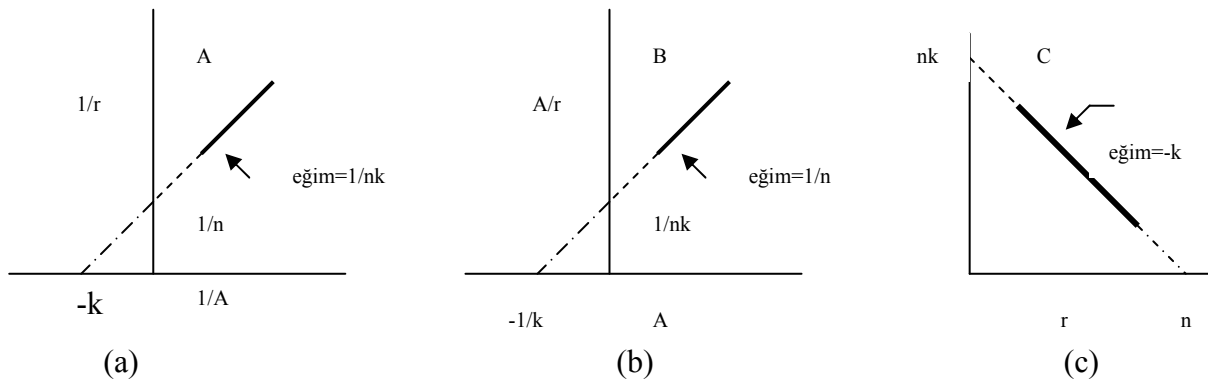
Bu denklemin parametrelerinin değerlendirilmesi için yaygın olarak birkaç çizgisel dönüşüm kullanılmıştır.

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk} \frac{1}{A} \quad (a)$$

$$\frac{A}{r} = \frac{1}{nk} + \frac{1}{n} A \quad (b) \quad (3.11)$$

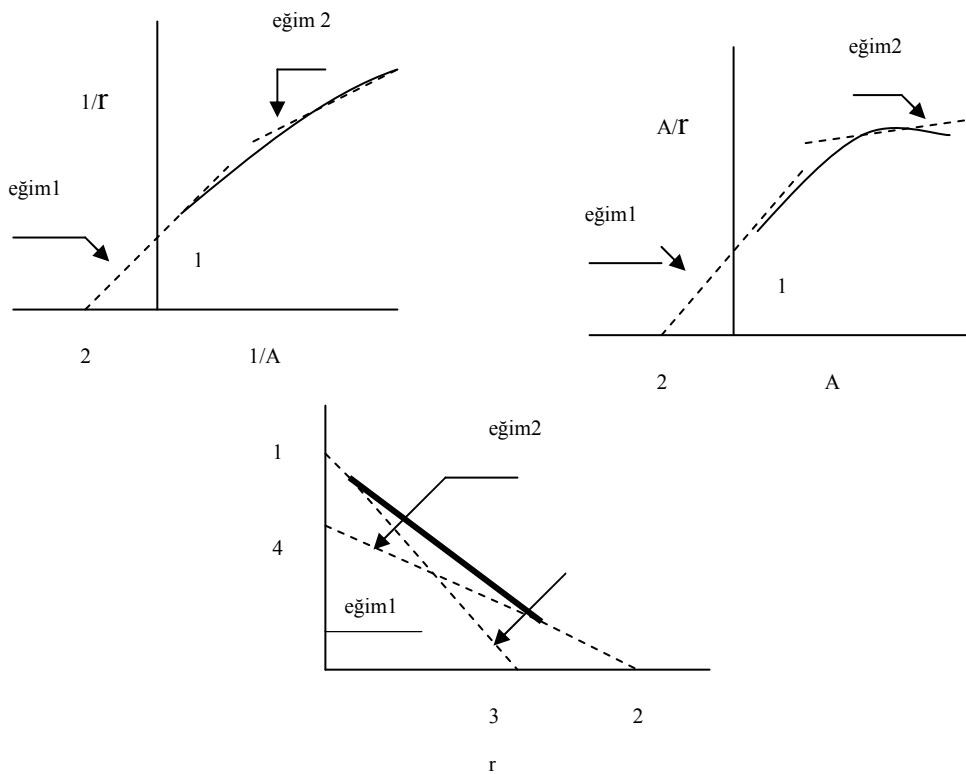
$$\frac{r}{A} = kn - kr \quad (c)$$

Bu eşitliklerin grafiksel eşdeğerleri şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Bağlanma yerlerinin bir tek yeri veya sınıfı için bağlanma denkleminin yaygın olarak kullanılan lineer dönüşümlerinin üç grafiksel gösterimi. Üç doğrunun eğimi ve kesişimleri işaret edilmiştir.

İki veya daha fazla bağlanma sınıflarının olduğu durumlarda şekil 3.1 deki koordinatlar ile gösterilen fonksiyonlar artık çizgisel grafikler vermemektedir. Ancak koordinat eksenleri üzerinde limit durumunda eğim ve kesişmeleri tayin etmek hala mümkün olabilmektedir(9,19).



Şekil 3.2 Sadece iki tür bağlanma yerine sahip, üç koordinat çiftleri için şematik eğriler.

3.2 Makromolekül ile Paramagnetik İyon Etkileşmesinin Magnetik Rezonans Çalışmalarından ε^* , K_a , K_D nin türetilmesi

Paramagnetik iyon varlığında bir çözeltinin su protonlarının rölaksasyon oranında meydana gelen artış(enhancement), önceki çalışmalarda aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir

$$\varepsilon^* = \frac{1/T_1^* - 1/T_{1(0)}^*}{1/T_1 - 1/T_{1(0)}} \quad (3.12)$$

T_1 Paramagnetik iyon varlığındaki, $T_{1(0)}$ ise iyon yokluğundaki durulma zamanını,* işaretli terimler ise makro molekül varlığındaki aynı parametreleri göstermektedirler.

İyon-Protein etkileşmelerinde paramagnetik iyon iki ayrı formda bulunabilir(serbest ve bağlı). Paramagnetik iyon olarak Mn(II) örnek olarak alınabilir.

Paramagnetik iyonun serbest(Mn_f) ve bağlı(Mn_b) formundan dolayı, proton durulma oranında gözlenen artış faktörü; bir ortalama değere sahiptir.

$$\overline{\varepsilon^*} = P_b \varepsilon_b + P_f \varepsilon_f$$

$$\varepsilon^* = \frac{Mn_b}{Mn_t} \varepsilon_b + \frac{Mn_f}{Mn_t} \varepsilon_f \quad (3.13)$$

Burada Mn_t toplam mangan konsantrasyonunu, ε_f serbest manganın artış faktörü(denk 3.12 deki tanımdan bire eşittir.), ε_b ise proteine bağlı manganın artış faktörüdür. P_b, P_f olasılıklardır.

$$P_b + P_f = 1 \quad (3.14)$$

olasılık tamlık koşulundan

$$\frac{Mn_b}{Mn_t} = 1 - \frac{Mn_f}{Mn_t} \quad (3.15)$$

yazılabilir. Bu eşitlik denk(3.13) te yerine yazıldığında

$$Mn_f = \left(\frac{\varepsilon_b - \varepsilon^*}{\varepsilon_b - 1} \right) Mn_t \quad (3.16)$$

$$Mn_b = \left(\frac{\varepsilon^* - 1}{\varepsilon_b - 1} \right) Mn_t \quad (3.17)$$

eşitlikleri elde edilir. Proteine bağlı manganın association sabiti (K_a) ve dissociation sabiti (K_d) için de birer eşitlik türetilebilir. Bir önceki kesimde

$$k_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{|E||S|}{|ES|}$$

olarak tanımlanan denklemde $|ES| = Mn_b$, $|S| = Mn_f$, $k_s = K_d$ ve $|E| = P_f$ yazıldığında ve $K_a = 1/K_d$ olduğu göz önüne alındığında

$$K_a = \frac{[Mn_b]}{[Mn_f][P_f]} \quad (3.18)$$

elde edilir. Burada $P_f = nP_t - Mn_b$ 'dur ve P_f, P_t serbest ve toplam protein konsantrasyonlarıdır.

Mn_f ve Mn_b için artış faktöründen türetilen denk (3.16) ve (3.17) kullanılıp gerekli kısaltmalar yapıldığında

$$K_a = \frac{(\varepsilon^* - 1)(\varepsilon_b - 1)}{(\varepsilon_b - \varepsilon^*) [nP_t(\varepsilon_b - 1) + Mn_t(1 - \varepsilon^*)]} \quad (3.19)$$

bulunur. Durulma artış oranı faktörü verisinden bağlanma sabitlerini denk (3.19) ile tayin etmek mümkün olabilmektedir. Ancak bunun için ε_b ve bağlanma yeri sayısı n 'in bilinmesi gerekmektedir. Deneysel çalışmalarda ε_b 'nin tayini için üç prosedür kullanılmıştır.

1. Protein ile iyon titrasyonu; Sabit konsantrasyondaki iyon solüsyonuna artan konsantrasyonda protein ilavesi ile yapılan ölçümlerde, $1/\varepsilon^*$ 'nin $1/P_t$ 'ye karşı çizilen grafiğinden bulmak.
2. İyon ile protein titrasyonu; Sabit konsantrasyondaki protein solüsyonuna artan konsantrasyonda iyon ilavesi ile yapılan ölçümlerde, $1/\varepsilon^*$ 'nin Mn_t 'ye karşı çizilen grafiğinden bulmak.
3. Serbest ve bağlı iyon konsantrasyonunun ESR ile ölçümüne dayalı olarak protein ve iyonun tek bir konsantrasyonundan ε^* 'ı tayin etmek.

BÖLÜM 4

BULGULAR

Bir önceki kesimde verilen deneysel verilerden ε_b 'nin bulunmasında kullanılan, değişken çiftleri arasındaki ilişki aşağıda iki ayrı prosedür için türetilmiştir.

4.1 Protein ile iyon titrasyonunda ($1/\varepsilon^*$)'nin teorik olarak türetimi

$$K_d = \frac{I}{K_a} = \frac{[Mn_f][P_f]}{[Mn_b]} = \frac{(Mn_t - Mn_b).P_f}{Mn_b} \quad (4.1)$$

$$(Mn_b).K_d = (Mn_t - Mn_b).P_f \quad (4.2)$$

$$(Mn_b).K_d + (Mn_b).P_f = (Mn_t).P_f \quad (4.3)$$

$$(Mn_b) = \frac{(Mn_t).P_f}{K_d + P_f} = \frac{(\varepsilon^* - 1)}{(\varepsilon_b - 1)}(Mn_t) \quad (4.4)$$

$$\varepsilon^* = \frac{P_f \varepsilon_b + K_d}{P_f + K_d} \quad (4.5)$$

$$\frac{1}{\varepsilon^*} = \frac{1}{\varepsilon_b} \left[\frac{K_d}{P_f + K_d / \varepsilon_b} + \frac{P_f}{P_f + K_d / \varepsilon_b} \right] \quad (4.6)$$

$P_t > K_d / \varepsilon_b$ iken $P_f \cong P_t$ olur.

$$\frac{I}{\varepsilon^*} = \frac{I}{\varepsilon_b} \left[\frac{K_d}{P_t} + \frac{P_t}{P_t} \right] \quad (4.7)$$

$$\frac{I}{\varepsilon^*} = \frac{I}{\varepsilon_b} + \frac{K_d}{\varepsilon_b} \left(\frac{I}{P_t} \right) \quad (4.8)$$

Denklemden görüldüğü gibi yüksek protein konsantrasyonlarında, $\frac{I}{\varepsilon^*}, \frac{I}{P_t}$, nin lineer bir fonksiyonu olur.

$$\varepsilon^* = \frac{(Mn_b)}{(Mn_t)} \varepsilon_b + \frac{(Mn_f)}{(Mn_t)} \varepsilon_f \text{ denkleminde yola çıkarak } (Mn_b) = (Mn_t) \text{ durumunda}$$

bağlanmayan mangan kalmayacak

$$\frac{(Mn_f)}{(Mn_t)} \rightarrow 0 \qquad \frac{(Mn_b)}{(Mn_t)} \rightarrow 1 \qquad \varepsilon^* = \varepsilon_b$$

olacaktır. Benzer şekilde

$$\frac{I}{\varepsilon^*} = \frac{K_d}{\varepsilon_b} \left(\frac{I}{P_t} \right) + \frac{I}{\varepsilon_b} \quad (4.9)$$

denkleminde de $P_t \rightarrow \infty$ olunca

$$\frac{I}{\varepsilon^*} = \frac{I}{\varepsilon_b} \quad , \qquad \varepsilon^* = \varepsilon_b$$

olmaktadır.

4.2 İyon ile Protein Titrasyonunda ($1/\varepsilon^*$)'nin teorik olarak türetimi

$$K_d = \frac{I}{K_a} = \frac{(Mn_t - Mn_b)(nP_t - Mn_b)}{Mn_b} \quad (4.10)$$

$$(Mn_b)^2 - [(Mn_t) + K_d + nP_t](Mn_b) + (Mn_t)nP_t = 0 \quad (4.11)$$

Mn_b için lineer olmayan ikinci dereceden bir denklemini çözmek durumundayız.

$$\frac{(Mn_b)}{(Mn_t)} = \frac{[(Mn_t) + K_d + nP_t] \pm \sqrt{[(Mn_t) + K_d + nP_t]^2 - 4(Mn_t)nP_t}}{2(Mn_t)} \quad (4.12)$$

$\lim_{Mn_t \rightarrow 0} \frac{Mn_b}{Mn_t} = \frac{0}{0}$ olmaktadır. Bu belirsizlikten L.Hospital kuralını uygulayarak

kurtulmamız mümkündür. Kural uygulandıktan sonra

$$\lim_{Mn_t \rightarrow 0} \frac{Mn_b}{Mn_t} = \frac{nP_t}{K_d + nP_t} \quad (4.13)$$

denklemini elde edilmektedir.

Eğer $nP_t > K_d$ ise tüm mangan bağlı olur.

$$\lim_{Mn_t \rightarrow 0} \frac{Mn_b}{Mn_t} = \frac{nP_t}{nP_t(K_d / nP_t + 1)} = 1 \quad (4.14)$$

$$\frac{Mn_b}{Mn_t} \rightarrow 1 \quad , \quad Mn_b = Mn_t$$

$$\frac{Mn_b}{Mn_t} = \frac{\varepsilon^* - 1}{\varepsilon_b - 1} = 1 \quad \text{ve } \varepsilon^* = \varepsilon_b \quad (4.15)$$

bulunur.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir çözeltideki paramagnetik iyonun varlığı çözeltinin $1/T_1$ oranını artırdığı NMR' nin ilk günlerinden beri bilinmektedir. Bu teorisin ana hatları kesim(1.8)'de paramagnetik durulma adı altında incelenmiştir. Bir paramagnetik iyonun bir protein veya enzime bağlı iken, su protonlarının durulma oranına etkisinin artışı(enhancement) bir fiziksel parametre olarak önceki çalışmalarda kullanılmış ve teorisi kesim(1.9)'da ayrıca verilmiştir. Bu çalışmalarda, paramagnetik metal iyonlar, protein ve enzimlerin aktif bağlanma yerlerinin incelenmesinde ve enzim aktivitelerinde önemli rol oynadıkları gözlenmektedir. Öte yandan bir makro molekülün bir mikro moleküle bağlanması durumunda denge ile ilgili denklemler türetilmiştir. Bu denklemlerin parametrelerinin değerlendirilmesi için birkaç çizgisel dönüşüm yaygın olarak kullanılmıştır(9). Farklı grafiklerdeki eğimler ve kesme yerlerinden parametreler değerlendirilmiştir. Durulma oranı artış faktörü ϵ^* kullanılarak ϵ_b , K_a ve K_D saptanmasında kullanılan prosedürlerden şu sonuçlar çıkarılmaktadır.

1. Protein –iyon titrasyonunda ; $1/\epsilon^*$, $1/P_t$ 'nin lineer fonksiyonunun eğimi K_D ve kesme yeri ise $1/\epsilon_b$ 'yi bulmamızı sağlamaktadır.
2. İyon- Protein titrasyonunda ; P_t nin yüksek konsantrasyonunda $1/\epsilon^*$, Mn_t 'nin lineer bir fonksiyonu olmakta ve yine kesme yeri $1/\epsilon_b$ 'yi bulmamızı sağlamaktadır.
3. Electron Spin Resonanstan Mn_f tayin edilerek de K_a ve K_D bulunabilir, ancak ikinci bir spektrometreye ihtiyaç duyulmaktadır.

Öte yandan ϵ_b si bilinen bir çözeltinin ϵ^* datasından bağlı (Mn_b) ve serbest (Mn_f) mangan miktarları tayin edilerek K_a ve K_D hesaplanabilir(11). Bir diğer durum, 3-11 denklemlerinde enhancement teorisinde kullanılan değişkenler kullanılarak kesme ve eğimlerden n(bağlanma yerlerin sayısı) ve bağlanma sabitleri bulunabilir.

Sonuç olarak yapılan inceleme, enhancement teorisinin, bir proteine veya bir enzime bağlanabilen paramagnetik iyonların bağlanma yerlerinin sayısını, bağlanma sabitlerini ve yapısal değişimlerin sebebiyle ϵ_b deki değişimin ilişkisini belirlemede kullanılan hızlı ve hassas bir metot sağladığını göstermiştir. Bu çalışmanın dayandığı görüşler, enhancement teorisinin protein ve enzime bağlanabilen paramagnetik metal iyonların geniş bir sınıfına uygulanabileceğini önermektedir.

KAYNAKLAR

- 1.ABRAGAM, A., 1961. The Principle of Nuclear Magnetism, **Oxford Pres.**
- 2.APAYDIN, F., 1979. Magnetik Rezonans, Temel İlkeler, **Çağdaş Fizik.**
- 3.BUDAK, H., 2005. Water Proton Relaxation Rate Enhancements and Association Constant for Mn(II) to Serum and Serum Proteins Determined by NMR T_1 Measurements, **Zeitschrift für Naturforschung C,(Baskıda).**
- 4.HENNEL, W.J.and KLINOWSKI, J.,1993. **Çekirdek Magnetik Rezonansın Temelleri(Çeviren:Semiha BAHÇELİ).ANKARA.**
- 5.HORNAK,J.P., 1997-1999. The Basics of NMR, **Roechester Instute of Technology,Newyork.USA.**
- 6.JENKINS,B.G., 1991. Site Specific Water Poroton Relaxation Enhancement of Iron(III) Chelates Noncovalently Bound to Human Serum Albümin, **Magnetic Resonance in Medicine 17,164-178.**
- 7.JONES,R.,DWEK,R.A., 1974. The Mechanism of Water Proton Relaxation Enzyme.Paramagnetik Ion Complexes, **Eur.J.Biochem, 47,271-283.**
- 8.KANG,Y.S.,GORE,J.S.,ARMITAGE,I.M., 1984. Studies of Factors Affecting The Design of NMR Contrast Agents:Mangnese in Blood as a Model System, **Magnetik Resonance in Medicine, 1,396-409.**
- 9.KLOTZ,I.M.,HUNSTON.D.L., 1971. Properties of Graphical Representation of Multiple Classes of Binding Sites, **Biochemistry, 16,3065-3069.**
- 10.KOWALEWSKI,J.,NORDENSKIOLD,L.,BENETIS,N.and WESTLUND,P., 1985. Theory of Nuclear Spin Relaxation in Paramagnetic Systems in Solutions, **Progress in NMR Spectroscopy, 17,141-185.**

- 11.MILDVAN,A.S.,COHN,M., 1963. Magnetic Resonance Studies of The Interaction of The Manganese Ion with Bovine Serum Albümin, **Biochemistry**, **2,910**.
- 12.NAVON,G., 1970. Proton Relaxation Times and Hydration Numbers of Manganese Ions Bound to Enzymes, **Chemical Physics Letters**, **3,390-394**.
- 13.ORAL,B., 1972. Magnetik Rezonans,**H.Ü.Müh.Fak.Fizik.Enst**.
- 14.PEACOCKE,A.R.,RICHARDS,R.E.,SHEARD,B., 1969. Proton Magnetic Relaxation in Solutions of E.Coli Ribosomal RNA Containing Mn(II) Ions., **Molecular Physics**, **16,177-189**.
- 15.REUBEN,J., 1971. Gadolinium(III) as a Paramagnetic Probe for Proton Relaxation Studies of Biological Macromolecules.Binding to Bovine Serum Albümin., **Biochemistry**, **15,2834-2838**.
- 16.SLİCHTER,C.P., 1963. Principles of Magnetic Resonance, **New York**.
- 17.SHERRY,A.D.,BIRNBAUM,E.R.,DARNALL,D.W., 1973.Proton Relaxation Studies in $H_2O - D_2O$ Mixtures. The Binding of Manganese to BSA., **Analytical Biochemistry**, **52,415-420**.
- 18.TABAK,F., 1994. NMR'ın Temelleri, **H.Ü.Müh.Fak**.
- 19.USLAN,A.H., 1997. Enzimoloji, **Ege Üni.Fen Fak**.

SEMBOLLER

ε^* :Proton Relaxation Oranı Artışı

$\vec{\mu}$:Magnetik Moment

γ :Jiromagnetik Oran

\vec{L} :Yörüngesel Açısal Momentum

\hbar :Planck Sabiti

\vec{I} :Çekirdek Spini

\vec{S} :Elektron Spini

\vec{H} :Magnetik Alan

H:Hamiltoniyen Operatörü

ω :Larmor Frekansı

$\vec{\tau}$:tork

\vec{M} :Mıknatıslanma Vektörü

T_1 :Spin Örgü Durulma Zamanı

T_2 :Spin Spin Durulma Zamanı

K_a :Bağlanma Sabiti

K_d :Ayrılma Sabiti

ÖZGEÇMİŞ

1980 Yılında Diyarbakır'ın Ergani ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Diyarbakır'da tamamladım.1998 yılında D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi fizik bölümünü kazandım ve 2002 yılında mezun oldum.2003-2004 Öğretim yılında D.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitime başladım.