

^{15}N NMR RELAKSASYONU İLE PROTEİN DİNAMİĞİ

DEVRİM GÜMRAL

Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche

Università Degli Studi di Udine

Udine, Italia

Özet: NMR relaksasyon süreçleri ve protein dinamiği ile bağlantısı özetlendikten sonra, deneysel ve dinamik parametreleri ilişkilendiren temel denklemlerin yorumlanması konusunda geliştirilen yöntemler açıklandı ve karşılaştırıldı.

Giriş

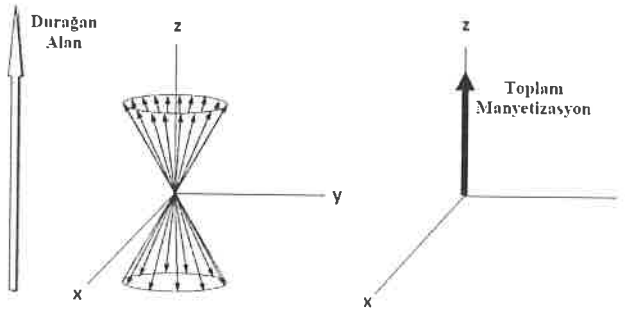
Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi atom çekirdeklerinin spin özelliği ile ilgilenir. Çekirdek spin numarası sıfırdan farklı olan atom çekirdekleri NMR spektroskopisi yöntemi ile gözlemlenebilirler. Proton olarak adlandırılan ^1H (hidrojen) atomu çekirdeği $\frac{1}{2}$ spinlidir ve biyolojik moleküllerde çokça bulunduğu için büyük öneme sahiptir. Bununla beraber ^{13}C (karbon) ve ^{15}N (azot) izotopları da $\frac{1}{2}$ spinlidirler ve NMR spektroskopisinde gözlemlenebilirler. ^1H 'in doğal bolluğu oldukça yüksektir (99,98 %), buna karşılık ^{13}C ve ^{15}N düşük doğal bolluğa sahiptirler (1,07 % ve 0,37%). Gözlenebilir bir rezonans sinyali elde edebilmek için ^{13}C ve ^{15}N NMR spektroskopisi çalışmalarında bu izotoplarla yapay yolla zenginleştirilmiş moleküllerin kullanılması zorunludur.

NMR spektroskopisi proteinlerin ve nükleik asitlerin 3-boyutlu yapılarının atomik çözünürlükte belirlenmesinde var olan yöntemler arasında en etkin olanıdır. Çünkü bu yöntem moleküllerin doğal, yani vücuttaki ortamlarına uygun olarak çözelti içinde gözlenmesine olanak tanır. 2002 Nobel Kimya ödülü, biyolojik makromoleküllerin yapı analizlerinin belirlenmesinde yeni yöntem olarak NMR spektroskopisinin geliştirilmesindeki katkılarından ötürü Kurt Wüthrich'e verilmiştir. NMR spektroskopisi yöntemleri 3-boyutlu yapıların belirlenmesine ek olarak, biyolojik moleküllerin dinamik özelliklerinin anlaşılmasında da oldukça etkilidir.

Proteinler hücrelerdeki bütün biyolojik olayların yapıtaşlarıdır. Proteinlerin biyolojik fonksiyonları onların 3-boyutlu yapıları ve özellikle dinamikleri ile yakından ilişkilidir. Proteinlerin yalnızca durağan 3-boyutlu yapılarının bilinmesi, onların biyolojik fonksiyonları ile olan ilişkiyi açıklamada yeterli olmayabilir. Örneğin; protein katlanması, protein-ligand etkileşmesi, enzim katalizi gibi önemli biyolojik süreçler proteinlerin değişik zaman ölçütlerindeki ve değişik genliklerdeki hareketlerinden kaynaklanan dinamik özelliklerine bağlıdır. Süreçlerin anlaşılması proteinlerin dinamiğinin anlaşılmasına bağlıdır. Bu nedenle, protein dinamiği çalışmaları, proteinlerin durağan 3-boyutlu yapılarının zamana göre değişiminin; proteinlerin bölgesel, yerel ve bütünsel hareketlerinin anlaşılması ve bu hareketlerin proteinlerin biyolojik fonksiyonlarıyla ilişkilendirilmesi bakımından oldukça önemlidir. Örnek olarak, fibrilleşme yoluyla amiloidojenik türden hastalıklara neden olduğu bilinen beta-2-mikroglobulin proteininin doğal ve mutant örneklerinin NMR relaksasyonu çalışmamızın sonucunu gösterebiliriz. Her iki proteinin üç-boyutlu yapıları birbirine oldukça yakın olmasına karşın, dinamik farklılıklar bize gösterdi ki; doğal proteinin biyolojik fonksiyonunu yerine getirmesi için gerekli iç dinamik özellikler aynı zamanda, fibrilleşme mekanizmasına zemin hazırlayan bir risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır [8].

Relaksasyon

NMR spektroskopisi çalışmaları proteinlerin değişik zaman ölçütlerindeki hareketleri hakkında atomik çözünürlükte bilgi sağlaması nedeniyle ayrıcalıklı ve tercih edilen bir yöntemdir. Sistemin $\frac{1}{2}$ spinli çekirdekler için çalışması basitçe şöyledir: NMR spektroskopisi deneylerinde bir tüpte bulunan çözelti içindeki protein örneği spektrometreye yerleştirildikten sonra ona güçlü (7.04 T, 11.7 T, 14.1 T, 18.8 T vb.) bir durağan manyetik alan uygulanır. Çekirdek spin enerji düzeyleri arasında uygulanan alanın büyüklüğüyle orantılı bir fark oluşur. Bir başka deyişle, NMR spektrometresinin manyetik alanı içindeki tüm çekirdeklerin manyetik momentleri bu manyetik alan vektörü boyunca aynı ya da zıt yönde konumlanır. Tüm çekirdeklerin manyetik momentlerinin vektörel toplamı, düşük enerji seviyesinde bulunan çekirdek nüfusunun daha fazla olması nedeniyle, sıfırdan farklı ve dış durağan manyetik alan yönünde bir toplam manyetizasyon vektörü verir (Şekil 1'e bakınız). Durağan manyetik alan etkisindeki çekirdek manyetik momentleri dış alan eksenine etrafında Larmor presesyonu denilen (topaç hareketi gibi) değişken eksenli dönme hareketi yaparlar.



Şekil 1. Çekirdek manyetik moment vektörlerinin dış durağan manyetik alan etkisi altında iken denge durumu dağılımı (solda), dış alanla aynı yönde yönelen bir toplam manyetizasyon vektörü (sağda) verir.

Çekirdekler, spin enerji seviyelerinin arasındaki farka uygun, dış durağan alana dik yönde gönderilen bir radyofrekans dalgası ile uyarılır. Bu olay toplam manyetizasyon vektörünün yönelimini değiştirir. Relaksasyon süreci, spin sisteminin toplam manyetizasyon vektörünün (uyarılma kesildikten sonra) dengeye dönerken zaman içindeki davranışı olarak tanımlanabilir. Çözelti içinde bulunan çekirdek spinlerinin relaksasyonu moleküllerin rastgele (Brownian) hareketinden kaynaklanan bölgesel ve değişken manyetik alanlar nedeniyle oluşur. Moleküllerin kendi etrafındaki bütünsel hareketleri ve tek molekül içindeki bölgesel hareketler bu değişken manyetik alanların kaynağıdır. Çekirdek spinlerinin denge durumuna gelmesi, öncelikle spin enerji geçişlerinin örüntü adı verilen çevredeki çekirdeklerle etkileşimi sonucu meydana gelir. Çözelti içindeki proteinin pikosaniye-nanosaniye (ps-ns) zaman ölçeğindeki hareketleri çekirdek spin relaksasyon oranlarında gözlemlenebilir değişikliklerle sonuçlanır.

Dinamik

Proteinlerin anazincir dinamiği ^{15}N ya da ^{13}C , yan zincir dinamiği ise genellikle ^{13}C ya da ^2H NMR relaksasyonu ile çalışılır. ^{15}N izotopu ile zenginleştirilmiş protein örneklerinin üretilmesi daha kolay ve ucuzdur. Ayrıca, ^{15}N çekirdekleri ile onların doğrudan bağlı oldukları ^1H çekirdekleri protein anazinciri boyunca dizilmiş ve birbirinden yalıtılmış iki-spinli bir sistem oluşturur ki; bu, dipolar etkileşmenin iyi tanımlanmasına ve etkisinin belirgin ve etkin olarak ölçülebilmesine olanak tanır. Sonuçta, relaksasyon verilerinin analizini ve anazincir dinamiğinin çalışılmasını daha etkin hale getirir. Bundan sonra yalnızca ^{15}N NMR relaksasyonundan sözedeceğiz.

Proteinlerin ^{15}N NMR relaksasyonunda etkin olan iki temel etkileşim mekanizması vardır. Bunlar, ^{15}N ve ^1H çekirdekleri arasındaki dipolar etkileşme ile bundan daha az etkin olarak kimyasal-kayma-anizotropisidir. Deneysel ölçümler molekülün iç dinamiğinin nanosaniye ile pikosaniye zaman ölçeklerinde analiz edilmesine olanak tanır. Buna ek olarak, mikrosaniye (μs) ile milisaniye (ms) zaman ölçeklerinde konformasyonel ya da kimyasal değişim hareketleri de belirlenebilir. Böylece protein dinamiği, relaksasyon zamanlarının veya bunların tersi olarak tanımlanan relaksasyon oranlarının ölçülmesiyle ayrıntılı olarak incelenebilir. NMR relaksasyon teorisinin temelleri [7], [10], [14] ve [18] kaynaklarında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Relaksasyon ve Dinamik

Bu bölümde ^{15}N NMR relaksasyonu ve bu çerçevede ^{15}N - ^1H (amid) bağının dinamiğinden bahsedeceğiz. ^{15}N NMR relaksasyon çalışmaları temel olarak üç parametrenin ölçülmesiyle başlar. Bunlar, uyarılmış durumdaki çekirdek manyetik moment enerji seviyelerinin denge durumundaki dağılımına gelme süresi, yani toplam manyetizasyon vektörünün denge konumuna gelmesi için gereken zaman sabiti olan düşey relaksasyon zamanı (T_1); uyarılmış durumdaki toplam manyetizasyon vektörünün yatay düzlemdeki bileşenlerinin yok olması için gereken zaman sabiti olan yatay relaksasyon zamanı (T_2) ve bunlara ek olarak ^1H çekirdek manyetik moment enerji seviyelerinin sürekli uyarılması ile doygunluğa erişmesi sonucunda spektrumda ^{15}N sinyal şiddetlerinde görülen değişikliğin ölçüsü olan iki-çekirdekli $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE değerleridir. Burada formülasyonun kolaylığı açısından relaksasyon zamanları yerine onların tersi olan relaksasyon oranları, yani $R_1 (=1/T_1)$ ve $R_2 (=1/T_2)$ kullanımını tercih ediyoruz. NOE parametresiyle bağlantılı olarak da R_{NOE} ile gösterilen çapraz-relaksasyon

oranını kullanıyoruz. R_1 , R_2 ve $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE relaksasyon parametreleri ^{15}N ile onun bağlı olduğu hidrojen atomu arasındaki bağın hareketine duyarlıdır. Çözelti içindeki bir proteinde farklı ^{15}N - ^1H bağ vektörleri için R_1 ve R_2 değerleri bazı durumlarda birbirinden oldukça farklı olabilir. Bunun nedeni R_1 ve R_2 oranlarının farklı hareket frekanslarına duyarlı olmasıdır. R_1 oranları bağ vektörünün ps-ns zaman ölçeğindeki hareketleri hakkında bilgi içerirken, R_2 oranları sözü edilen aynı zaman ölçeğine ek olarak ayrıca μs -ms zaman ölçeğindeki hareketlere de duyarlıdır. Daha kesin bir şekilde, relaksasyon parametreleri, ω_N ve ω_H sırasıyla ^{15}N ve ^1H çekirdeklerinin Larmor frekansları olmak üzere, ^{15}N - ^1H bağının hareketini belirleyen beş farklı (0 , ω_N , ω_H , $\omega_H - \omega_N$, $\omega_H + \omega_N$) frekanstaki spektral yoğunluk fonksiyonlarına bağlıdır. Ölçülebilen üç relaksasyon parametresi, $J(\omega)$ ile gösterilen spektral yoğunluk fonksiyonunun beş farklı frekansta örneklenmesi olarak düşünülebilir [1]. Başka bir deyişle, spektral yoğunluk fonksiyonu molekül hareketinden kaynaklanan rastgele süreçlerin belirli bir frekansta relaksasyona yol açabilme potansiyelini tanımlar.

R_1 ve R_2 parametreleri HSQC tipinde iki-boyutlu NMR deneylerinde ölçülen sinyal şiddetlerinin sönümü zamanından elde edilir. Bu deneylerde, spektrumdaki sinyal şiddetleri, uyarıcı radyofrekans puls dizisi içinde incelenmek istenen relaksasyon sürecinin etkin olduğu noktada, gittikçe genişleyen zaman aralıklarında, yani sistemin daha fazla relaks olmasına olanak tanıyarak ölçülür. $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE parametresi ise bir başka tür HSQC tipinde iki-boyutlu NMR deneylerinde ^1H çekirdeklerinin doygunluğa ulaştırdığı ve ulaştırılmadığı durumlarda ölçülen sinyal şiddetlerinin oranlarından elde edilir. NMR relaksasyon çalışmalarında kullanılan değişik deneysel ölçüm teknikleri için [20] kaynağını ve bu kaynağın içindeki diğer kaynakları önerebiliriz.

Temel Denklemler

1961 yılında Abragam yaptığı hesaplamalarla, çözelti içindeki moleküller için deneysel yöntemlerden bulunan relaksasyon oranlarının beş farklı frekanstaki spektral yoğunluk fonksiyonlarının doğrusal bileşimi olarak

$$R_1 = 3d^2J(\omega_N) + d^2J(\omega_H - \omega_N) + 6d^2J(\omega_H + \omega_N) + c^2J(\omega_N)$$

$$R_2 = 2d^2J(0) + \frac{3d^2}{2}J(\omega_N) + \frac{d^2}{2}J(\omega_H - \omega_N) + 3d^2J(\omega_H) \\ + 3d^2J(\omega_H + \omega_N) + \frac{2c^2}{3}J(0) + \frac{c^2}{2}J(\omega_N) + R_{ex}$$

$$R_{NOE} = -d^2J(\omega_H - \omega_N) + 6d^2J(\omega_H + \omega_N)$$

şeklinde yazılabildiğini gösterdi [1]. Burada, R_{NOE} oranı

$$R_{NOE} = (NOE - 1) \frac{\gamma_N}{\gamma_H} R_1$$

ile verilir. γ_N ve γ_H , sırasıyla ^{15}N ve ^1H 'in jiromanyetik oranlarıdır. Temel denklemlerde görülen R_{ex} terimi, moleküldeki bir bölgenin konformasyonel değişimi ya da bir çekirdeğin farklı bir moleküldeki aynı tür çekirdek ile kimyasal değişimi süreçleri var olduğunda, süreç

dahil olan bağ vektörü için yatay relaksasyon oranına eklenmesi gereken artırıcı katkısı göstermektedir. Denklemlerdeki sabitlerin açık ifadesi

$$d^2 = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_N^2 \gamma_H^2}{4 \langle r_{NH} \rangle^6} \quad \text{ve} \quad c^2 = \frac{1}{3} \omega_N^2 \Delta\sigma_N^2$$

ile verilir. Bu sabitlerden d^2 , ^1H ile ^{15}N çekirdekleri arasındaki dipolar etkileşme ve c^2 ise kimyasal-kayma-anizotropisi ile ilişkili sayılardır. Sabitlerdeki işaretlerden μ_0 , boşluk için manyetik geçirgenlik katsayısını; $\hbar$, Plank sabitinin 2π 'ye bölünmesiyle elde edilen sayısı; γ_N ve γ_H , sırasıyla ^{15}N ve ^1H 'in jiromanyetik oranlarını; ω_N , ^{15}N 'un Larmor frekansını; $\langle r_{NH} \rangle$, ^{15}N - ^1H bağının ortalama bağ uzunluğunu ve $\Delta\sigma$, eksenel simetrik ^{15}N kimyasal-kayma-anizotropisi tensörünün paralel ve dik bileşenleri arasındaki farkı göstermektedir. Örneğin; 11.74 Tesla'lık durağan dış manyetik alan için, $\langle r_{NH} \rangle = 1.02 \text{ \AA}$ ve $\Delta\sigma = -173 \text{ ppm}$ alındığında, $d^2 = 1.30 \times 10^9 \text{ rad}^2 \text{ s}^{-2}$ ve $c^2 = 1.01 \times 10^9 \text{ rad}^2 \text{ s}^{-2}$ olur.

Dinamik Analiz: Modelden-Bağımsız Yöntem

Her ne kadar temel denklemler 1961 yılından beri biliniyor ise de, bu denklemlerden hareketle etkin analiz ve yorumlama yöntemlerinin geliştirilmesi uzun zaman almıştır. Denklem sisteminde ölçülebilen üç relaksasyon parametresi kullanılarak bilinmeyen beş farklı spektral yoğunluk fonksiyonu, bu fonksiyonların formu için kabul edilebilir bir varsayım olmaksızın birbirinden bağımsız olarak çözülemez. Bu problemle ilişkili olarak 1982 yılında Lipari ve Szabo [16], [17] NMR relaksasyon verilerinin analizi için "Modelden-Bağımsız" (MB) olarak adlandırılan bir yöntem geliştirdiler. Bu yönteme modellen bağımsız denmesinin nedeni, bağ vektörünün molekül içi hareketini fiziksel bir modele dayalı olmadan incelemesidir. Lipari ve Szabo'dan önce, NMR relaksasyon verilerinin analiz ve yorumlamaları için kullanılan modellere örnek olarak, tekli bağlar etrafında serbest dönü modeli, çoklu bağlar etrafında serbest dönü modeli, çoklu bağlar etrafında sınırlandırılmış dönü modeli, bir koni içerisinde sallanma modeli, tekli bağ etrafında serbest dönü ile koni içerisindeki sallanma birleşiminden oluşan model ve kesikli atlama modelleri sayılabilir [7].

MB yöntem çözelti içindeki proteinin bütünsel hareketinin izotropik olduğunu ve bununla beraber proteindeki bir bağ vektörünün iç hareketinin, proteinin bütünsel dönü hareketinden bağımsız olduğunu varsayar. Bu varsayımlar her bir bağ vektörünün oto-korelasyon fonksiyonunu, iç harekete ait oto-korelasyon fonksiyonu ile bütünsel harekete ait oto-korelasyon fonksiyonlarının çarpımı olarak $C(t) = C_{\text{bütünsel}}(t) \cdot C_{\text{iç}}(t)$ şeklinde tanımlamaya olanak tanır. Bir ^{15}N - ^1H bağ vektörünün zamana göre yeniden yönelimini tanımlayan oto-korelasyon fonksiyonunun Fourier transformu, yukarda söz ettiğimiz ve dinamikte doğrudan ilişkili spektral yoğunluk fonksiyonunu verir. Oto-korelasyon fonksiyonunun çarpım olarak kabul edilmesi, spektral yoğunluk fonksiyonunun iki Lorentzian fonksiyonun toplamı olarak

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2 \tau_m}{(1 + \omega^2 \tau_m^2)} + \frac{(1 - S^2) \tau_c'}{(1 + \omega^2 \tau_c'^2)} \right), \quad \tau_c' = \frac{\tau_m \tau_c}{(\tau_m + \tau_c)}$$

şeklinde yazılmasına yol açar. Böylece, ilk ortaya atılan MB yönteme göre bir proteinin dinamiği Lorentzian fonksiyonlarındaki üç parametreye ilişkilendirilmiş olur. Bunlar; bağ

vektörünün uzaysal hareketinin sınırını ya da genliğini belirleyen S , bağ vektörünün etkin iç korelasyon zamanı τ_e ve molekülün bütünsel dönü korelasyon zamanı τ_m parametreleridir.

τ_m , S^2 ve τ_e dinamik parametreleri, relaksasyon parametrelerinin en küçük kareler yöntemi kullanılarak varsayılan spektral yoğunluk fonksiyonuna uydurulmasıyla belirlenebilir. 1989'da ilk olarak Kay'ın ^{15}N relaksasyon verilerinin analizi için MB yöntemi başarıyla uygulamasından [13] sonra, bu yöntem büyük bir ilgi gördü ve gittikçe artan bir uygulayıcı kitlesine ulaştı. Bir yıl sonra bu yöntem beş dinamik parametre daha eklenerek Clore tarafından geliştirildi [5], [6] ve daha sonra buna genişletilmiş-MB yöntem adı verildi. Genişletilmiş-MB yöntemde yeni tanımlanan dinamik parametrelerden birisi konformasyonel ya da kimyasal değişim sürecini dikkate alan R_{ex} parametresi, diğerleri ise iç hareketlerin yavaş ve hızlı olarak birbirinden farklı iki zaman ölçeğinde olabileceğini dikkate alan parametrelerdir. Böylece iç dinamiği tanımlayan parametreler, s (yavaş) ve f (hızlı) etiketleri taşıyan τ_f , τ_s , S_f^2 ve S_s^2 olarak genişletildi. Geliştirilmiş haliyle MB yöntem, Tablo 1'de verilen beş farklı model ile NMR relaksasyon verilerinin analizini yapan etkin bir yöntemle dönüştürülmüş oldu.

Tablo 1. Modelden-Bağımsız yöntem çerçevesinde tanımlanan spektral yoğunluk fonksiyonları.

model	spektral yoğunluk fonksiyonları	optimize edilen parametreler
1	$J(\omega) = \frac{1}{2} [S_f^2 \tau_m / (1 + \omega^2 \tau_m^2)]$	S_f^2
2	$J(\omega) = \frac{1}{2} [S_f^2 \tau_m / (1 + \omega^2 \tau_m^2) + (1 - S_f^2) \tau_f' / (1 + \omega^2 \tau_f'^2)]$	S_f^2, τ_f'
3	$J(\omega) = \frac{1}{2} [S_f^2 \tau_m / (1 + \omega^2 \tau_m^2)]$ ve $R_{2(nhr)} = R_2 + R_{ex}$	S_f^2, R_{ex}
4	$J(\omega) = \frac{1}{2} [S_f^2 \tau_m / (1 + \omega^2 \tau_m^2) + (1 - S_f^2) \tau_f' / (1 + \omega^2 \tau_f'^2)]$ ve $R_{2(nhr)} = R_2 + R_{ex}$	S_f^2, τ_f', R_{ex}
5	$J(\omega) = \frac{1}{2} [S^2 \tau_m / (1 + \omega^2 \tau_m^2) + S_f^2 (1 - S_s^2) \tau_s' / (1 + \omega^2 \tau_s'^2)]$	S_s^2, S_f^2, τ_s'
$\tau_f' = \tau_m \tau_f / (\tau_m + \tau_f), \quad \tau_s' = \tau_m \tau_s / (\tau_m + \tau_s), \quad S^2 = S_f^2 S_s^2$		

Genişletilmiş haliyle MB yöntem, günümüzde halen NMR relaksasyon verilerini analiz etmede en yaygın kullanılan yöntemdir. Ancak, her ne kadar modelden bağımsız olarak adlandırılssa da, yukarıdaki tablodan da görüldüğü üzere en fazla üç dinamik parametre deneysel ölçümlerle ilişkilendirilebilmekte, diğerleri için varsayımlar yapılmaktadır. Ayrıca, spektral yoğunluk fonksiyonunun Lorentzian seçilmesi, gerçekte molekülün bütünsel dönüşünün izotropik olduğu varsayımına dayanmaktadır. MB yöntemde anizotropik durumlar için, molekülün anizotropik bütünsel dönüşü için Woessner tarafından geliştirilmiş

tanımlamalarla [26], yukardakilerden daha karmaşık spektral yoğunluk fonksiyonları da kullanılmaktadır [4].

Dinamik Analiz: İndirgenmiş Spektral Yoğunluk Gönderimi Yöntemi

Temel denklemlerin çözülmesine farklı bir yaklaşım deneysel yolla ölçülebilir relaksasyon parametrelerinin sayısının artırılması olabilirdi ve 1992 yılında Peng ve Wagner [23] bazı ek relaksasyon deneyleri yaparak altı relaksasyon parametresi ölçmeyi başardılar. Böylece beş tane spektral yoğunluk fonksiyonunu doğrudan hesaplayabildiler. Çalışma, yüksek frekanslardaki spektral yoğunluk fonksiyonlarının, yani $J(\omega_{H-N})$, $J(\omega_H)$ ve $J(\omega_{H+N})$ 'nin değerlerinin birbirine çok yakın olduğunu, buna karşılık daha alçak frekanstaki diğer iki spektral yoğunluk fonksiyonu $J(0)$ ve $J(\omega_N)$ 'den belirgin derecede farklı olduklarını gösterdi. Bu sonuç, yaklaşık aynı zamanda birden fazla araştırmacının spektral yoğunluk gönderimi yöntemini basitleştirmesine yol açtı. Yüksek frekanslardaki birbirine çok yakın üç spektral yoğunluk fonksiyonu $J(\omega_{H-N}) \cong J(\omega_H) \cong J(\omega_{H+N})$ 'nun tek bir spektral fonksiyon ile temsil edilebileceği anlaşıldı [12], [9], [15]. Bu yeni yöntem "İndirgenmiş Spektral Yoğunluk Gönderimi" (İSYG) yöntemi denildi. Buluşçulardan Farrow, söz konusu tek spektral fonksiyonunun $J(0.87\omega_H)$ olduğunu hesapladı [9]. Sonuçta, Abragam tarafından verilen beş bilinmeyenli üç doğrusal denklem sistemi

$$\begin{bmatrix} J(0) \\ J(\omega_N) \\ J(0.87\omega_H) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{-3}{4(3d^2 + c^2)} & \frac{3}{2(3d^2 + c^2)} & \frac{-9}{10(3d^2 + c^2)} \\ \frac{1}{(3d^2 + c^2)} & 0 & \frac{-7}{5(3d^2 + c^2)} \\ 0 & 0 & \frac{1}{5d^2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R_1 \\ R_2 \\ R_{NOE} \end{bmatrix}$$

şeklindeki basit ve tek çözüme sahip matris denklemine indirgenmiş oldu. İSYG yönteminin MB yöntemine göre üstünlüğü spektral yoğunluk fonksiyonunun formu için herhangi bir varsayımda bulunmayışıdır. Buna karşılık bağ vektörünün iç hareketinin genliğiyle (yani; S parametresi ile) ilişkili bilgi verememesi bir zayıflık olarak ortaya çıkar. İSYG yöntemi özellikle MB ve genişletilmiş-MB yöntemlerinin varsayımlarının geçerli olmadığı durumlarda; örneğin, protein dinamiği hakkında hiçbir özel varsayımın gerçekleşemediği katlanmamış ya da kısmen katlanmış proteinlerde, bağ vektörünün iç hareketinin molekülün bütünsel dönü hareketiyle çiftlendiği durumlarda, vb., tercih edilmelidir [14]. [11] kaynağında verilen çalışmamızda, rat thyroid transcription factor 1 (TTF-1) proteininin homeodomain (DNA'ya bağlanan bölge) anazincir dinamiği için relaksasyon verilerinin MB yöntem ile işlenmesi tutarsız sonuçlar vermiş, buna karşılık İSYG yöntemi ile bağlanma bölgesinin dinamiği başarılı bir şekilde açıklanabilmektedir. Benzer bir tutarsızlık durumu kaynak [3]'de verilen çalışmada HIV-1 capsid proteininin C terminal kısmının W40A mutan (CACW40A) için de gözlenmiştir. Buna rağmen, her iki yöntemin bazı dinamik özellikler için tutarlı sonuçlar verdiği [24], [19], [25] proteinlerin de olduğu gözönüne alındığında, her iki yöntemin protein dinamiği analizlerinde birbirini tamamlayıcı yöntemler olarak kullanılabileceği açıktır.

Daha önce de söz ettiğimiz gibi çözelti içinde bulunan proteindeki bir çekirdeğin farklı bir moleküldeki çekirdekle kimyasal değişimi, ya da proteindeki bir bölgede gözlenen

konformasyonel değişim süreçleri μs - ms zaman ölçeğindedir ve yatay relaksasyon oranında artışa neden olur. Buna bağlı olarak $J(0)$ spektral yoğunluk fonksiyonunda da bir artış olur. Bir ^{15}N - ^1H bağı için hesaplanan $J(0)$ değerinin fazla yüksek olması, o bağ için sözü geçen yavaş zaman ölçeğindeki sürece işaret eder. Bu sürecin yatay relaksasyon oranına katkısı temel denklemlerde R_{ex} terimi ile gösterilmiştii.

μs - ms zaman ölçeğindeki konformasyonel değişim hareketleri genellikle proteinlerin moleküler tanıma bölgelerinde bulunduğundan veya moleküler tanıma sürecine bağlı olarak moleküller arası etkileşmeden etkilendiğinden, proteinlerde bu hareketlerin nerelerde olduğunun ve büyüklüğünün belirlenmesi büyük önem taşır. Konformasyonel/kimyasal değişim sürecinin hızlı ya da yavaş olmasına bağlı olarak R_{ex} in belirlenmesinde farklı tipte NMR deneyleri yapılır ve farklı tür relaksasyon oranları ölçülür. Bundan başka, konformasyonel/kimyasal değişim sürecinin hızlı olması durumunda R_{ex} , uygulanan dış durağan manyetik alanın karesine bağlıdır. Bu nedenle birden fazla dış durağan alan altında yapılan relaksasyon ölçümleri R_{ex} teriminin hesaplanmasına olanak tanır. R_{ex} in belirlenmesinde ve büyüklüğünün ölçülmesinde çeşitli yöntemler ileri sürülmüştür. Bu yöntemler için [21], [2] ve [22] kaynaklarını ve bunlardaki diğer kaynakları önerebiliriz.

Özet ve Diğer Uygulamalar

Bu çalışmada, çözelti içindeki proteinler için ^{15}N NMR relaksasyon ölçümlerinden elde edilen parametrelerin analizi ve yorumlanması için en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden bahsettik. Bu yöntemlerle proteinlerin bütünsel dönü zamanlarının yanı sıra, bağ vektörlerinin ps-ns zaman ölçeklerindeki iç hareketleri ve genliklerinin tayin edilebileceğini gösterdik. Ayrıca, biyolojik fonksiyon ile yakından ilişkili olan μs - ms zaman ölçeğindeki konformasyonel değişim hareketlerinin de belirlenebileceğinden bahsettik. Bunlara ek olarak, MB yönteminden elde edilen S^2 parametreleri kullanılarak proteinlerde yerel konformasyonel entropi hesabı da yapılabilir.

Relaksasyon deneyleri, birden fazla sıcaklıkta ya da pH değerinde, veya birden fazla protein konsantrasyonu için yapıldığında elde edilen zengin veriler proteinler için daha fazla özelliklerinin belirlenmesine olanak tanır. Örneğin, konsantrasyona bağlı ölçümlerden proteinlerin oligomerleşme durumları hakkında bilgi edinmek, ya da sıcaklığa bağlı ölçümlerden termodinamik özellik olan yerel ısı kapasitesini hesaplamak mümkündür.

NMR relaksasyon çalışmaları sadece tek bir proteinin dinamik çalışmasında değil, bundan başka protein-protein ya da protein-ligand etkileşmelerinin incelenmesinde de yaygınca kullanılır. Çözelti içine hem incelenecek protein hem de onun bağlanacağı molekül yerleştirildiğinde, relaksasyon çalışmaları incelenen proteinin bağlanma nedeniyle hangi bölgelerinde dinamik farklılıklar gösterdiğinin anlaşılmasını sağlar. Özellikle proteinlerin DNA veya RNA'ya bağlanma, proteinlerin enzimlerle birleşik yapılar oluşturma konularında çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllarda "Hücre içi NMR" tekniklerinin de geliştirilmesine çalışılmaktadır. Bu tekniklerin, canlı hücre içerisindeki biyolojik moleküllerin fonksiyonlarını yerine getirirken aynı zamanda yapı ve dinamiklerinin de incelenebilecek olması heyecan vericidir.

Teşekkür

Çalışmayı sunma, yazma ve sevgili Prof. Dr. Erdal İnönü'yü özlemle anma olanağı yaratan Ulusal Mekanik Komitesine ve Kongre Düzenleme Kuruluna minnettarım. Bu çalışmaya ilgisi ve yazımını teşvik etmesinden dolayı Prof. Dr. Mithat İdemem'e, ve eleştirel okumasından dolayı Prof. Dr. Hasan Gümrall'a teşekkür ederim.

Kaynaklar

- [1] Abragam A., "*The Principles of Nuclear Magnetism*", Clarendon Press, Oxford 1961.
- [2] Akke M., "NMR methods for characterizing microseconds to millisecond Dynamics in recognition and catalysis", *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2002, 12:642-647.
- [3] Alcaraz L.A., Álamo del M., Mateu M.G., Neria L.N., "Structural mobility of the monomeric C-terminal domain of the HIV-1 capsid protein", *FEBS Journal* 2008, 275:3299-3311.
- [4] Atkinson R. A., Kieffer B., "The role of protein motions in molecular recognition: insights from heteronuclear NMR relaxation measurements", *Prog. In Nuc. Mag. Reson. Spec.* 2004, 44: 141-187.
- [5] Clore G.M., Szabo A., Bax A., Kay L.E., Driscoll P.C. & Gronenborn A.M., "Deviations from the simple two-parameter model-free approach of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation in proteins", *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112: 4989-4991.
- [6] Clore G.M., Driscoll P.C., Wingfield P.T. & Gronenborn A.M., "Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 β using two-dimensional inverse detected heteronuclear 15N-1H NMR spectroscopy", *Biochemistry* 1990, 29:7387-7401.
- [7] Dayie K.T., Wagner G. and Lefèvre J.F., "Theory and Practice of Nuclear Spin Relaxation in Proteins", *Annu. Rev. Phys. Chem* 1996, 47:243-282.
- [8] Esposito G., Ricagno S., Corazza A., Rennella E., Gümrall D., Mimmi M.C., Betto E., Pucillo C.E.M., Fogolari F., Viglino P., Raimondi S., Giorgetti S., Bolognesi B., Merlini G., Stoppini M., Bolognesi M., Bellotti V., "The controlling roles of Trp60 and Trp95 in β_2 -microglobulin function, folding and amyloid aggregation properties", *J. Mol. Biol.* 2008, 378:887-897.
- [9] Farrow N.A., Zhang O., Szabo A., Torchia D.A. and Kay L.E. "Spectral density function mapping using ^{15}N relaxation data exclusively", *J. Biol. NMR* 1995, 6:153-162.
- [10] Fischer M.F.W., Majumdar A., Zuiderweg E.R.P., "Protein NMR relaxation: theory, applications and outlook", *Prog. Nuc. Mag. Res. Spec.* 1998, 33:207-272.
- [11] Gümrall D., Nadalin L., Corazza A., Fogolari F., Damante G., Viglino P. and Esposito G., "Helix mobility and recognition function of the rat thyroid transition factor 1 homeodomain – hints from ^{15}N -NMR relaxation studies", *FEBS Journal*, 2008, vol: 275(3), 435-448.
- [12] Ishima R. and Nagayama K., "Quasi-spectral density function analysis for nitrogen-15 nuclei in proteins", *J. Magn. Reson. B* 1995, 108:73-76.
- [13] Kay L.E., Torchia D.A. and Bax A., "Backbone dynamics of proteins as studied by 15N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease", *Biochemistry* 1989, 28:8972-8979.
- [14] Korzhnev D.M., Billeter M., Arseniev A.S., Orekhov V.Y., "NMR Studies of Brownian tumbling and internal motions in proteins", *Prog. Nucl. Magn. Res. Spec.* 2001, 38:197-266.

- [15] Lefèvre J.F., Dayie K.T., Peng J.W. and Wagner G., "Internal mobility in the partially folded DNA binding and dimerization domains of GAL4: NMR analysis of the N-H spectral density functions", *Biochemistry* 1996, 35:2674-2686.
- [16] Lipari G. and Szabo A., "Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity", *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 104:4546-4559.
- [17] Lipari G. and Szabo A., "Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results", *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104:4559-4570.
- [18] Luginbühl P., Wüthrich K., "Semi-classical nuclear spin relaxation theory revisited for use with biological macromolecules", *Prog. Nucl. Magn. Res. Spec.*, 2002, 40:199-247.
- [19] Nicastro G., Margiocco P., Cardinali B., Stagnaro P., Caglia F., Cuniberti C., Collini M., Thomas D., Pastore A., Rocco M., "The Role of Unstructured Extensions in the Rotational Diffusion Properties of a Globular Protein: The Example of the Titin I27 Module", *Biophys. J.* 2004, 87:1227-1240.
- [20] Palmer III A.G., "NMR probes of molecular dynamics: overview and comparison with other techniques", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2001, 30:129-155.
- [21] Palmer III A.G., Kroenke C.D., Loria J.P., "Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules", *Methods. Enzymol.* 2001, 339:204-238.
- [22] Palmer III A.G., Massi F., "Characterization of the dynamics of biomacromolecules using rotating-frame spin relaxation NMR spectroscopy", *Chem. Rev.* 2006, 106:1700-1719.
- [23] Peng J.W. and Wagner G., "Mapping of the spectral densities of N-H bond motions in EglN c using heteronuclear relaxation experiments", *Biochemistry* 1992, 31:8571-8586.
- [24] Renner C. and Holak T.A., "NMR ^{15}N relaxation of the insulin-like growth factor (IGF)-binding domain of IGF binding protein-5 (IGFBP-5) determined free in solution and in complex with IGF-II", *Eur. J. Biochem.* 2001, 268:1058-1065.
- [25] Scian M., Marin M., Bellanda M., Tou L., Alexander J.M., Rosenblatt M., Chorev M., Peggion E., Mammin S., "Backbone Dynamics of Human Parathyroid Hormone (1-34): Flexibility of the Central Region Under Different Environmental Conditions", *Biopolymers (Peptide Science)* 2006, 84:147-160.
- [26] Woessner D.E., "Nuclear spin relaxation in ellipsoids undergoing rotational Brownian motion", *J. Chem. Phys.* 1962, 37:647-654.