

Preliminary Note

PN 1241

Zur Wirkung von Neutralsalzen auf die Lichtabsorption und magnetische Suszeptibilität von Metmyoglobin und Methämoglobinen

Der Einfluss von Neutralsalzen auf Hämoproteide ist unter verschiedenen Gesichtspunkten bearbeitet worden. Viele Eigenschaften z.B. des Hämoglobins sind durch Neutralsalze zu beeinflussen, wie die Löslichkeit¹, die Molekülgrösse²⁻⁵, die O₂-Bindung⁶, kernmagnetische Relaxation⁷, um nur einige zu nennen. Auch Veränderungen der Lichtabsorption durch Salze sind bekannt. Abgesehen von den bekannten komplexbildenden Salzen (Fluoride, Azide, Cyanide usw.) sind auch die Anionen von Neutralsalzen wie NaCl, KCl z.B. am sauren Ferricytochrom *c* (Cyt-2H⁺) spektral aktiv, wobei eine an der Soretbande gut erkennbare Bildung einer Dichloridverbindung des Cyt-2H⁺ eintritt (Cyt-2H⁺ + 2Cl⁻)⁸. Auch Br⁻ bzw. SO₄²⁻ erwiesen sich ähnlich wirksam. Bei unseren Untersuchungen über die Wasserbindung von Ferrihämoproteiden beobachteten wir in Gegenwart hoher Elektrolytkonzentrationen eine spektrale Veränderung von Methämoglobin (MetHb) bzw. Metmyoglobin (MetMb), die sich jedoch in ihrer Natur von dem Salzeffekt am Cyt-2H⁺ abgrenzen lässt:

Werden einer Menschen-MetHb- bzw. Pferde-MetMb-Lösung steigende Mengen von Salzen, wie NaCl, KCl, MgCl₂, (NH₄)₂SO₄ u. dgl. zugesetzt, ändert sich ihre Löslichkeit¹. Teilweise steigt sie, meist aber wird sie reduziert, was zur Ausfällung bzw. zur Kristallisation des Proteids führt. Die Lichtabsorption dieser Proteide ist in der Regel auch bei molaren Salzkonzentrationen kaum modifiziert. Hingegen tritt bei weiterer Erhöhung der Elektrolytkonzentration eine auffällige spektrale Änderung ein, die z.B. bei den sauren Formen des MetMb bzw. MetHb als Braun-Rot-Farbwechsel imponiert. In NaCl oder KCl erfolgt der Umschlag der Lichtabsorption nur partiell, in gesättigter MgCl₂-Lösung hingegen fast vollständig. Das resultierende Spektrum besitzt Parahämatincharakter, Na₂S₂O₄-Zugabe bewirkt eine Reduktion des Parahämamins zu einem Hämochromogen (vgl. Fig. 1). Die eingetretene Veränderung des MetMb bzw. MetHb ist nicht auf eine Denaturierung des Proteins zurückzuführen. Bei Erniedrigung der Elektrolytkonzentration (10-fache Verdünnung mit Wasser) tritt das ursprüngliche MetHb bzw. MetMb-Spektrum bzw. in Gegenwart von Na₂S₂O₄ das des reduzierten Hb bzw. Mb wieder auf. Der Salzeffekt ist somit reversibel. HbCO bzw. neutrales Cytochrom *c* sind spektral unempfindlich gegen hohe Elektrolytkonzentrationen.

Parallel zu den spektralen Vorgängen ändert sich die Suszeptibilität der Hämoproteide. Die magnetischen Momente des MetMb bzw. MetHb sind im starken Elektrolytmilieu vermindert. So sinkt bei Halbsättigung einer MetHb-Probe mit MgCl₂ das magnetische Moment deutlich ab, obwohl unter diesen Bedingungen nur eine partielle Umwandlung in die Parahämatinstruktur erfolgt ist (vgl. Tabelle I). Zur Diamagnetismuskorrektur diente eine völlig analog behandelte HbCO-Lösung, so dass Veränderungen des spezifischen Partialvolumens des Proteids im Salzmilieu berücksichtigt sind.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die durch hohe Elektrolytkonzentrationen bewirkten Dehydratisierungs- und Entquellungs Vorgänge am Protein eine Anlagerung von basischen Proteingruppierungen (Imidazol) an das Fe der prosthetischen Gruppe zur Folge haben. Die prosthetische Gruppe selbst wird dabei deaquotisiert. Damit gleichen diese Vorgänge den analogen spektralen und magnetischen Veränderungen, wie sie durch eine unmittelbare Wasserentfernung, z.B. durch Gefriertrocknung des MetHb bzw. MetMb hervorgerufen werden⁹⁻¹¹.

Da hohe Elektrolytkonzentrationen auch benutzt werden, um Hämoproteide zur Kristallisation zu bringen, liegt die Frage nahe, inwieweit in so hergestellten Kristallen

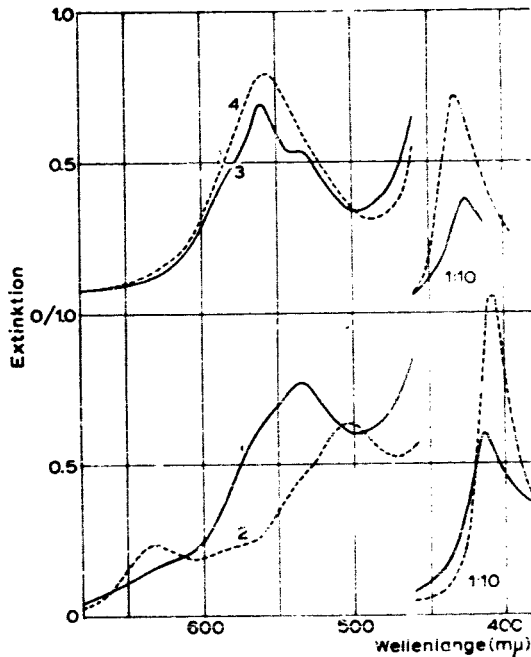


Fig. 1. Lichtabsorption von Pferde-Mb und -MetMb in gesättigter $MgCl_2$ -Lösung (—) sowie nach 10-facher Verdünnung mit Wasser (---). Mb = $1.02 \cdot 10^{-4} M$; $t = 20^\circ$; Kuvette 0.5 cm bzw. 0.05 cm (Soretbande). Kurve 1: MetMb, pH 5.18; Kurve 2: wie 1, 10-fach verdünnt, pH 4.95; Kurve 3: Reduzierter Mb, aus 1 mittels $Na_2S_2O_4$ hergestellt, pH 5.08; Kurve 4: wie 3, 10-fach verdünnt, pH = 4.70.

TABELLE 1

VERÄNDERUNG DES MAGNETISCHEN MOMENTES EINER MENSCHEN-MetHb-LÖSUNG
BEI HALBSÄTTIGUNG MIT $MgCl_2$

$t = 22^\circ$; $[MetHb] = 3.96 \text{ mM}$ (bezogen auf Fe)

Ansatz:	pH	μ_{eff} , BoHR Magneton
Methämoglobin ohne Zusätze	6.9	5.3
ditto nach 24 h	6.9	5.4
Methämoglobin + gesättigte $MgCl_2$ (1:1)	5.9	3.8
Methämoglobin + Pyridin (1:1)	7.0	2.3

eine partielle Dehydratisierung des Proteins und Deaquatisierung des Hämins eingetreten sein kann. Für das MetMb scheint das nicht zuzutreffen, da auf Grund von Elektronen-Resonanz-Spektrum-Messungen am Kristall¹² der Spinzustand des Fe^{2+} 5/2 ist, was den Befunden am gelösten Molekül entspricht. Nur sind nach unseren Erfahrungen beim MetMb die Salzkonzentrationen, die eine Parahämatinbildung erzwingen, sehr hoch, sie liegen beim Menschen-MetHb und einigen anderen MetHb-Arten aber wesentlich niedriger. Es soll deshalb auf die Möglichkeit aufmerksam gemacht werden, dass in diesen Fällen durch den beschriebenen Salzeffekt gewisse Unterschiede in den Eigenschaften des kristallisierten und des gelösten Hämoproteidmoleküls eintreten können.

Institut für Pharmakologie, Universität Greifswald,
Greifswald (Deutschland)

W. SCHELER
H. J. THIELE
I. SCHELER

¹ E. J. COHN, *Naturwissenschaften*, 20 (1932) 663.

² K. O. PEDERSEN UND K. J. I. ANDERSSON, zit. bei T. SVEDBERG UND K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge*, Steinkopff, Dresden, 1940, S. 373.

³ N. BENHAMOU UND G. WEILL, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 548.

⁴ N. BENHAMOU, M. DAUNE, M. JACOB, A. LIZATTI UND G. WEILL, *Biochim. Biophys. Acta*, 37 (1960) 1.

⁵ A. ROSSI-FANELLI, E. ANTONINI UND A. CAPUTO, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 391.

⁶ A. ROSSI-FANELLI, E. ANTONINI UND A. CAPUTO, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 397.

⁷ R. LUMRY, H. MATSUMIYA, F. A. BOVEY UND A. KOWALSKY, *J. Physic. Chem.*, 65 (1961) 837.

⁸ E. BOERI, A. EHRENBERG, K. G. PAUL UND H. THEORELL, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 273.

⁹ D. KEILIN UND E. F. HARTREE, *Nature*, 170 (1952) 161.

¹⁰ W. SCHELER, G. SCHOFFA UND F. JUNG, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 83.

¹¹ G. SCHOFFA, W. SCHELER, O. RISTAU UND F. JUNG, *Acta Biol. Med. Germ.*, 3 (1959) 65.

¹² J. E. BENNETT, J. F. GIBSON UND D. J. E. INGRAM, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, 240 (1957) 67.

Eingegangen am 30. November, 1962

Revision eingegangen am 28. Januar, 1963