

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON HÄMIN- UND HÄMOPROTEINDERIVATEN AUF DIE KERNMAGNETISCHE PROTONENRELAXATION WÄSSRIGER LÖSUNGEN

W. SCHELER

Pharmakologisches Institut der Ernst Moritz Arndt-Universität, Greifswald (Deutschland)

(Eingegangen am 10. September, 1962)

SUMMARY

Investigations on the influence of haemin and haemin derivatives on the nuclear-magnetic relaxation of water protons

Haemin, haemin derivatives and ferric haemoproteins are investigated on their influence on the nuclear-magnetic relaxation of water protons. The effectiveness increases in the following order: ferricytochrome *c* (neutral form), horse methaemoglobin, horse metmyoglobin, cheironomus methaemoglobin, ferricytochrome *c* (acidic form), haematin.

The high effectiveness of the haematin is already decreased by the adsorptive bonding to polyvinylpyrrolidone.

The influence on the relaxation of water protons may be divided into a magnetic and a steric component, the latter is thought to be a relative measure for the accessibility of the prosthetic groups in the haemin derivatives. It is shown, that the haemin groups in cytochrome *c* and cheironomus methaemoglobin are situated at the surface more than those of horse methaemoglobin or horse metmyoglobin. By the bonding of ligands to the horse methaemoglobin the influence of the iron on the relaxation of water protons is attributable not only to the variation of the magnetic moment but also to the variation of the steric arrangement of the prosthetic group to the protein. The methaemoglobin fluoride compound shows especially striking behaviour.

EINLEITUNG

Paramagnetische Stoffe sind hoch wirksam, die kernmagnetische Relaxation von Protonen wässriger Lösungen zu beschleunigen. Die longitudinale (T_1) und transversale Relaxationszeit (T_2) der Wasserprotonen werden bei Anwesenheit z.B. von $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, Hämin u.a. erheblich verkürzt. Die Effektivität der Paramagnetika auf die Protonenrelaxation hängt dabei u.a. davon ab, in welchem Masse sich paramagnetisches Teilchen und Wassermoleküle einander nähern können. Es wurde deshalb diese Methode benutzt, um die räumliche Zugänglichkeit der prosthetischen

Abkürzungen: DMFA, Dimethylformamid; PVP, Polyvinylpyrrolidon.

Gruppen in Hämoproteiden abzuschätzen. So konnten DAVIDSON UND GOLD¹ bzw. KON UND DAVIDSON² zeigen, dass die Hämingruppe des Walmyoglobins oberflächlicher liegen muss als die Hämine z.B. im menschlichen Hämoglobin. LUMRY, MATSUMIYA, BOVEY UND KOWALSKY³ studierten dann mit gleicher Methodik die Relaxations-Effektivität des reduzierten Myoglobins bzw. Hämoglobins, sowie den Einfluss verschiedener denaturierender Prozeduren, der sich im allgemeinen in einer Intensivierung der Wirkung kund tut.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Messungen der Effektivität der Beeinflussung der Wasserprotonenrelaxation auch auf andere Hämoproteide auszudehnen, weiterhin die Wirkung des Hämins unter wechselnden Bedingungen zu prüfen, sowie die Auswirkung der Ligandenbindung an das Fe(III) des Methämoglobins zu analysieren. Gleichzeitig sollten die Untersuchungen dazu dienen, unsere früheren Befunde über Häm-in-Protein- sowie Häm-in-Milieu-Wechselwirkungen^{4,5} zu erweitern.

MATERIAL UND METHODIK

Präparate

Folgende Häminkörper kamen zur Verwendung: Pferdemetmyoglobin wurde nach THEORELL⁶ gewonnen und mehrfach umkristallisiert. Chironomusmethämoglobin lag als gereinigtes Präparat vor, seine Gewinnung wurde früher von uns beschrieben⁷. Pferdemethämoglobin erzeugten wir intraerythrocytär mittels NaNO₂, dann wurden die braunen Erythrocyten 4-5 Mal mit 0.9%iger NaCl-Lösung gewaschen, mittels destilliertem Wasser hämolysiert und schliesslich die Stromareste hochtourig abzentrifugiert. Cytochrom c wurde aus Rinderherzen nach der Methode von KEILIN UND HARTREE⁸ erhalten. Häm-in (Ferriprotoporphyrin) wurde unter geringer Modifikation des SCHALFEJEFF'schen Vorgehens gewonnen⁹.

Vorbereitung der Messproben

Die Ferrihämoproteide wurden mittels einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert und danach in einem D₂O/H₂O-Gemisch (95 Vol. % D₂O-5 Vol. % H₂O) gelöst, so dass ihre Endkonzentration etwa bei 7 · 10⁻⁴ Mol Fe/l lag. Die genauen Konzentrationen dieser Ansätze wurden spektralphotometrisch bestimmt, wobei 1:10 mit H₂O bzw. wässrigem Puffer verdünnt wurde. Den Konzentrationsberechnungen wurden die für normales wässriges Milieu angegebenen Extinktionskoeffizienten zugrundegelegt, der geringe Anteil D₂O (9.5 %) in dieser verdünnten Lösung wurde vernachlässigt. Wenn Salze zugesetzt werden sollten, wurden statt einer Menge von 0.05 ml H₂O pro 1.0 ml Endvolumen jeweils 0.05 ml einer 2 M Salzlösung zugefügt. Die Salzkonzentration lag dann bei 0.1 M. Bei einigen Ansätzen wählten wir eine 10⁻³ M Endkonzentration. Die fertigen Lösungen wurden in Messröhrchen gefüllt und diese verschmolzen. Die Konzentration der Häm-in-Lösungen wurden durch Einwage der trockenen Kristalle festgelegt. Einige der Häminklösungen enthielten ausser dem D₂O/H₂O-Gemisch zusätzlich noch basische Lösungsmittel, wie Dimethylformamid bzw. Pyridin in den unten angegebenen Konzentrationen.

Das angeführte Polyvinylpyrrolidon hatte ein mittleres Molekulargewicht von 36000.

Neben den Ferrihämoproteiden bzw. Häminderivaten wurden unter jeweils analogen Bedingungen entsprechende diamagnetische Vergleichsproben wie Häm-

chromogene und dgl. gemessen, um lediglich den Einfluss des paramagnetischen Anteils auf die Protonenrelaxation berücksichtigen zu können.

Apparative Anordnung

Zur Messung der kernmagnetischen Relaxationszeiten (T_1) diente ein Spin-Echo-Spektrometer für 16 MHz Protonenresonanzfrequenz, über das an anderer Stelle ausführlich berichtet wurde¹⁰. Die aus der Amplitude des Spin-Echos nach einem $\pi - \frac{\pi}{2} - \pi$ -Impulstrippel bei Variation des Abstands der ersten beiden Impulse ermittelten Relaxationszeiten sind auf ca. 10 % genau. Dieser Fehler ist im wesentlichen auf die zeitliche Inkonzistenz des Magnetfeldes (nichtstabilisierter Permanentmagnet) zurückzuführen. Orientierende Messungen der transversalen Relaxationszeiten (T_2) an einigen Proben zeigten innerhalb der Messgenauigkeit die gleiche Tendenz wie die entsprechenden T_1 -Werte. Die Probentemperaturen betrugen bei allen Untersuchungen $24^\circ \pm 1^\circ$. pH-Messungen wurden mittels Glaselektrode und Röhrenvoltmeter vorgenommen. Die spektrale Kontrolle der Reaktionsansätze erfolgte mit einem Spektralphotometer der Fa. Zeiss, Jena.

Auswertung

Die kernmagnetischen Relaxationszeiten von Flüssigkeiten werden durch gelöste paramagnetische Teilchen stark beeinflusst. Dies liegt an den im Verhältnis zu den Kernmomenten um ca. 3 Größenordnungen höheren magnetischen Momenten der Elektronenhüllen dieser Teilchen, wodurch u.a. eine stärkere Kopplung zwischen Kernspinsystem und Gitter bewirkt wird, die sich in einer Verkürzung der longitudinalen Relaxationszeit T_1 äussert. Die resultierende Relaxationsrate der Lösung ($1/T_1$) setzt sich additiv aus dem Anteil infolge der Wechselwirkung mit den paramagnetischen Teilchen und dem Anteil infolge Wechselwirkungen der Protonen untereinander und mit allen übrigen Teilchen einschliesslich der Proteinkomponente der Hämoproteide zusammen. Durch die Bestimmung der Relaxationsrate einer gleichkonzentrierten analog zusammengesetzten diamagnetischen Vergleichslösung ($1/T_1$)_v kann $1/T_1$ auf den Anteil infolge der Wechselwirkung mit den paramagnetischen Teilchen reduziert werden: $1/T_1 - (1/T_1)_v$, bzw. unter Berücksichtigung der molaren Konzentration c der paramagnetischen Teilchen ergibt sich $[1/T_1 - (1/T_1)_v] \cdot 1/c = (1/T_1)_M$. $(1/T_1)_M$ ist proportional $\mu^2 F(a)$, da unter recht allgemeinen Voraussetzungen $\mu_{eff} = \mu$ gilt. a ist hierbei der minimale Abstand, bis auf den sich Protonen des Milieuwassers dem paramagnetischen "Kern" des Hämoproteids nähern können. Die Zugänglichkeit der paramagnetischen prosthetischen Gruppen in einem Hämoprotein und insbesondere ihre Abhängigkeit $F(a)$ vom minimalen Abstand a wird in der Literatur unterschiedlich betrachtet. So verwenden DAVIDSON UND GOLD¹ $F(a) \sim (1/a)$, WISHNIA¹¹ geht aus von $F(a) \sim (1/a)^2$, während LUMRY *et al.*² die Zugänglichkeit als unabhängig von a annehmen. Inwieweit diese verschiedenen Deutungen der Zugänglichkeit berechtigt sind, wird in der nachfolgenden Arbeit von PFEIFER genauer dargestellt¹².

Wenn wir nun als sterischen Faktor der Relaxationseffektivität eines paramagnetischen Hämoproteids die um den magnetischen Faktor reduzierte Grösse

$$\frac{1}{\mu^2} (1/T_1)_M = \frac{1}{\mu^2 c} \left[\frac{1}{T_1} - \left(\frac{1}{T_1} \right)_v \right]$$

verwenden, muss dabei berücksichtigt werden, dass ausser a noch andere Faktoren die Zugänglichkeit der prosthetischen Gruppe wesentlich beeinflussen können. So steckt z.B. in $F(a)$ noch die Elektronenrelaxationszeit τ_e und τ_s kann für verschiedene Proteide durchaus verschiedene Werte annehmen. Der sterische Faktor ist also nur dann ein relatives Mass der Zugänglichkeit (d.h. der Geometrie und der Geschwindigkeit des Austausches mit dem Milieuwasser), wenn bei den verglichenen Teilchen sich τ_e nicht geändert hat. Dieses Problem und der Einfluss der Nullfeldaufspaltung wird nachfolgend von PFEIFER ausführlich diskutiert²¹. Diese Einschränkungen führen dazu, dass im allgemeinen nur qualitative Aussagen über die Lage der prosthetischen Gruppen gemacht werden können. Als diamagnetisches Vergleichshämoprotein verwendeten wir im Falle des Cytochrom c das mittels $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ hergestellte Ferrocyclochrom c , für die übrigen Ferrihämoproteide setzten wir den Wert des Globin-Hämochromogens ein, der exakt zur Korrektur des $(1/T_1)$ -Wertes des Pferdemeihämoglobins diente und in erster Näherung auch zur Korrektur für das Pferdemeihämoglobin oder Chironomusmethämoglobin herangezogen wurde.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Häm in und Häminderivate

Die bisherigen Studien über die Beeinflussung der Protonenrelaxation des Wassers durch Häminkörper sind in der Regel mit dem im alkalischen Milieu gelösten Häm in (Häm in, Hydroxo-Aquo-Häm in) bzw. mit dem menschlichen Methämoglobin bzw. Walmetmyoglobin und ihren reduzierten Stufen durchgeführt worden¹⁻³. Da wir die Hämoproteide im weiteren Sinne als Komplexe des Eisenporphyrins auffassen müssen, erschien es notwendig, auch einfache Häminderivate in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Wir wählten hierfür das Pyridin-Häm in und DMFA-Häm in (vgl. Tabelle I). Durch die Bindung von Stickstoffbasen (z.B. Pyridin) erniedrigt sich das magnetische Moment des Häm in von 3.2 auf 1.96 μ_B (Ref. 13). Es sollte damit also eine Verminderung der Relaxations-Efektivität verbunden sein, die auch gefunden wurde. So beträgt $(1/T_1)_M$ für das Häm in 1602 und für den Pyridin-Häm in-Komplex 488 ($M^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot l$). Eine entsprechende Erniedrigung wurde auch für das DMFA-Häm in beobachtet.

TABELLE I

EINFLUSS VON PROTOHÄM IN AUF DIE PROTONENRELAXATION
VON WASSER UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN

T_1 des reinen $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Gemisches betrug 7.5 sec, nach CO -Durchströmung (O_2 -Entfernung) 23.6 sec.

Lösungen	Konz. ($\mu M \cdot l^{-1}$)	pH	T_1 (sec)	$1/(T_1 \cdot c)$ ($M^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot l$)	$(1/T_1)_M$ ($M^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot l$)
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$	650	> 11	0.85	1810	1502
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} + \text{CO}^*$	750	10.62	6.40	268	—
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} + 7.5 M$ DMFA	740	5.2	1.02	1325	983
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} + 7.5 M$ DMFA	740	ca. 8	1.48	914	572
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} + 7.5 M$ DMFA + CO	750	7.58	3.90	342	—
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} + 3.2 M$ Pyridin	750	> 11	1.89	706	488
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} + 3.2 M$ Pyridin + CO	750	7.28	6.10	218	—
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} + 7.10^{-4} M$ PVP	650	> 11	4.18	368	281
Häm in in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} + 7.10^{-4} M$ PVP + CO	750	> 11	15.40	87	—

* Bildung eines leichten Bodensatzes in diesem Ansatz.

Das alkalische Hämatin ist ein Hydroxo-Aquo-Komplex des Eisenporphyrins. Bei Ansäuerung geht es in eine reine Aquo-Struktur über (= Aquohämin¹⁴). Dieses ist unter normalen Bedingungen nicht in Lösung zu halten, es aggregiert und flockt aus. Es ist aber zu erwarten, dass dieses Aquohämin noch deutlich effektiver die kernmagnetische Protonenrelaxation des Wassers beeinflusst. Einen Hinweis dafür bietet das im DMFA-Wassergemisch gelöste Hämatin, das bei pH-Erniedrigung einige Zeit stabil ist, und das unter diesen Bedingungen eine stärkere Relaxations-Effektivität aufweist als das im alkalischen Milieu gelöste Produkt, $(1/T_1)_M$ beträgt im sauren hierbei 983 gegen 572 ($M^{-1} \cdot sec^{-1} \cdot l$) im alkalischen.

Im Hinblick auf die Befunde bei den Hämoproteiden erhob sich als nächstes Problem die Frage, inwieweit bereits durch eine oberflächliche adsorptive Bindung des Hämins an ein präformiertes Makromolekül die Relaxations-Effektivität beeinflusst wird. In diesem Falle liegt somit ein Hämin-Träger-System ohne spezifische Hämin-Bindung vor, während ja die Hämoproteide durch eine hochspezifische Hämin-Eiweiss-Bindung gekennzeichnet sind und dadurch funktionell charakterisiert und festgelegt werden.

Wie der Tabelle I entnommen werden kann, wird in dem Hämin-PVP-System die Effektivität der Beeinflussung der Protonenrelaxation ganz erheblich reduziert, $(1/T_1)_M$ beträgt 281. Hämatin-PVP besitzt ein niedriges magnetisches Moment, wir fanden bei $pH > 11$ und bei 22° , $\mu_{eff.} = 2.07 \mu_B$. Die Verminderung der Relaxations-Effektivität ist somit zu einem grossen Teil auf das niedrigere $\mu_{eff.}$ des Hämin-PVP zurückzuführen.

Versucht man nun zwischen magnetischem und sterischem Anteil der Relaxations-Effektivität zu differenzieren, so ergibt sich folgendes Bild (Tabelle II).

TABELLE II
STERISCHE UND MAGNETISCHE ANTEILE DER RELAXATIONS-EFFEKTIVITÄT
VERSCHIEDENER HÄMINKÖRPER

	Hämatin*	Pyridin-Hämatin*	PVP-Hämatin
$(1/T_1)_M$	1602	488	281
μ^2	10.24	3.88	4.28
$1/\mu^2 \cdot (1/T_1)_M$	156	126	66

* Die magnetischen Momente wurden der Zusammenstellung von HARTREE¹⁵ entnommen.

Der "sterische Anteil" $1/\mu^2 (1/T_1)_M$ des Hämatins liegt danach bei 156—verglichen mit ca. 325 des $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$. Durch die Komplexbildung mit Pyridin wird, der Erwartung gemäss, der sterisch effektive Anteil an der Wirkung auf die Protonenrelaxation nur schwach verringert, stark hingegen der magnetische Anteil. Erst bei der oberflächlichen adsorptiven Bindung an das PVP sinkt die sterische Komponente der Relaxations-Effektivität sehr stark ab, $1/\mu^2 (1/T_1)_M$ erreicht etwa den Wert 66.

Hämoproteide

In Erweiterung der Untersuchungen von DAVIDSON UND GOLD¹ bzw. KON UND DAVIDSON² sowie der Befunde von LUMRY *et al.*³ bzw. WISENIA¹¹ bezogen wir in unsere Studien das Pferdehyoglobin, das Pferdehämoglobin, das Chironomushämo-

globin sowie die neutrale und saure Form des Rinder cytochrom *c* ein. Es sollten damit die Spezies Abhängigkeit der Hämoglobine sowie ein funktionell von den O_2 -Überträgern differentes Proteid geprüft werden. Wir wählten dafür das Cytochrom *c*, weil es sich von den Aquo-Komplexen der Häm- und Myoglobine durch seine Anhydro-Struktur sowie seinen völlig anderen Bindungstyp der prosthetischen Gruppe unterscheidet. Die Ergebnisse dieser Messungen finden sich in Tabelle III.

Aus den gewonnen Daten lassen sich folgende Feststellungen ableiten:

(a) Bei den reversibel O_2 -bindenden Hämoproteiden, deren oxydierte Stufen verglichen werden sollen, bestehen deutliche Spezies- bzw. Molekulardifferenzen. Das zeigt sich noch mehr, wenn auch die bereits bekannten Werte des Metmyoglobins bzw. des menschlichen Hämoglobins¹⁻³ berücksichtigt werden. Es ergibt sich dann in der Relaxations-Effektivität etwa folgende Reihenfolge:

$$\text{Menschen-Hb} \approx \text{Pferde-Hb} < \text{Pferde-Mb} < \text{Chironomus-Hb} < \text{Wal-Mb}$$

(b) Der Einfluss des neutralen Ferricytochrom *c* auf die kernmagnetische Relaxation der Wasserprotonen ist geringer als der der Methämoglobine bzw. Metmyoglobine, $(1/T_1)_M$ beträgt 265 ($\text{sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{l}$). Das entspricht der Erwartung, da eine weitgehend kovalente Komplexstruktur des Hämeisens vorliegt und die 5. und 6. Koordinationsstelle des Zentralions durch basische Gruppen der Eiweisskomponente unmittelbar besetzt sind. Ausserdem bestehen Thioätherbindungen zwischen Porphyrin und Protein. Diese Komplexstruktur findet ausser im magnetischen Moment u.a. im bekannten Hämochromogen- bzw. Parahämatspektrum des Ferro- bzw. Ferricytochrom *c* seinen Ausdruck. Sie geht aber im stärker sauren Milieu verloren. Das Ferricytochrom *c* erfährt spektral stark aktive Strukturänderungen mit einem pK' -Wert von 2.5, wobei der Parahämattyp der Lichtabsorption in einen Methämoglobintyp, und mit pK' ca. 0.4, wobei der Methämoglobintyp in einen dem sauren Hämatin entsprechenden Typ übergeht¹⁷. Wie der Tabelle III zu entnehmen ist, steigt $(1/T_1)_M$ bei pH 0.9 auf etwa 1124 ($\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{l}$) an, liegt somit im Bereich der Metmyoglobine bzw. des Chironomusmethämoglobins.

(c) Auch bei den Hämoproteiden ist nun die Differenzierung zwischen magnetisch und sterisch wirksamen Anteil der Relaxations-Effektivität aufschlussreich. Für den letzteren ergeben sich die Werte aus Tabelle IV (zum Vergleich sind noch einige ergänzende Daten hinzugefügt).

Danach lassen sich bei den geprüften Ferrihämoproteiden 3 Gruppen einteilen. Besonders stark abgeschirmt müssen die prosthetischen Gruppen der Vertebratenhämoglobine (Mensch, Pferd) liegen. Der sterische Anteil der Relaxations-Effektivität des Eisens wird in ihnen durch das umgebende Protein bemerkenswert abgeschwächt. Eine Zwischenstellung nimmt das Pferde-Mb ein und die dritte Gruppe wird durch das Rinder cytochrom *c*, das Wal-Mb, sowie durch das Chironomus-Hb gebildet. In diesen Hämoproteiden müssen die prosthetischen Gruppen sehr oberflächlich angeordnet sein. Für das Wal-Mb ist dies durch die Röntgenstrukturanalyse bekannt^{18,19}. Vermutlich dürfte also auch beim Chironomus-Hb eine ähnliche Lage der Hämingruppen in Frage kommen. Bereits früher haben wir auf die sehr gute Zugänglichkeit der prosthetischen Gruppen des Chironomus-Hb hingewiesen^{4,20}. Die $1/\mu^2 \cdot (1/T_1)_M$ -Werte des letzteren sowie des Wal-Mb streben dem Wert des PVP-Hämins zu, sind aber noch deutlich von ihm verschieden. Da die Häminanlagerung an das präfor-

TABELLE IV

STERISCH WIRKSAME ANTEILE DER RELAXATIONS-EFFEKTIVITÄT VERSCHIEDENER FERRIHÄMOGLOBINE UND ANDERER HÄMIKÖRPER

Verbindung	$1/\mu^2 (1/T_1)M$
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	ca. 3.25
Hämatin	150
Hämatin-Pyridin	126
Hämatin-PVP	60
Chironomus-Hb	30
Wal-Mb	30
Saures Rinderythrochrom c	37
Neutrales Rinderythrochrom c	33
Pferde-Mb	22
Pferde-Hb	8-11
Menschen-Hb	8

TABELLE III

EINFLUSS VON FERRIHÄMOGLOBINEN AUF DIE KERNMAGNETISCHE RELAXATION VON WASSERPROTONEN

Species	pH	$K_{\text{konst.}}$ ($\mu\text{f} \cdot \text{l}^{-1}$)	T_1 (sec)	$1/(T_1 \cdot c)$ ($M^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)	$1/(T_1)M$ ($M^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)	μ (Bohr Magnetone)	$1/\mu^2 (1/T_1)M$
Ferrocyclochrom c	6.19	785	8.50	150	205	2.81**	33
Ferrocyclochrom c	5.42	785	3.07	415	1124	5.50**	37
Ferrocyclochrom c	9.90	785	1.00	1274
Globin-Pan-	9.83	808	6.38	194
chromogen	7.40	675	2.80	529	335	5.65***	11
Methämoglobin	6.65	990	0.80	1263	1069	5.26***	39
Mutinyoglobin	6.50	820	1.32	924	730	5.73***	22

* Bezogen auf Eisen.

** Siehe Ref. 15.

*** Siehe Ref. 16.

TABELLE V

RELAXATIONS-EFFEKTIVITÄT VERSCHIEDENER PFERDEMETHÄMOGLOBIN-KOMPLEXE

Pferde-Hb(III)-Verbindung	Salz	Art	$K_{\text{konst.}}$ (M^{-1})	Hb(III)-Konz. ($\mu M \cdot l^{-1}$)	pH	% Umsatz in den Komplex	T_1 (sec)	$1/(T_1 \cdot c)$ ($M^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)	$1/(T_1)M$ korrig. Wert ($M^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)	$1/(T_1)M/\mu^2$
Donat. Globin-Hämochrom	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	Spur	808	808	9.83	6.38	2.80	194	335	10.5
Hb(III)- H_2O	—	—	675	675	7.40	2.80	3.02	529	215	(6.75)**
Hb(III)- H_2O	KCl	0.1	675	675	7.08	79	0.77	409	2106	63.5
Hb(III)-F	KF	0.1	880	880	7.62	81	0.53	1924	2326	70.3
Hb(III)-F	KF	0.1	808	808	7.38	63	2.14	2144	416	14
Hb(III)-OOCH	KOOC	0.1	675	675	7.43	90	3.47	578	427	7.6
Hb(III)-OCN	KOCN	0.1	808	808	9.72	99	3.05	406	211	7.2
Hb(III)-OCN	KOCN	0.1	810	810	7.50	68	3.28	377	111	4.4
Hb(III)-SCN	KSCN	0.01	675	675	7.23	100	5.07	302	98	18
Hb(III)-N ₃	NaN ₃	0.1	675	675	7.78	100	5.65	262	68	10.8
Hb(III)-CN	KCN	0.1	675	675	10.85	100	5.65	262	68	10.8

* Bezogen auf Eisen-Konzentration.

** Es wurde hierbei der gleiche μ -Wert (5.65) wie für das salzfreie Hb(III) angenommen.

mierte PVP nur oberflächlich erfolgt, andererseits z.B. im Myoglobin die prosthetische Gruppe in einer Tasche des Proteins sitzt^{18,19} ist die Differenz der $1/\mu^2 \cdot (1/T_1)_M$ -Werte zwischen beiden Körpern sehr plausibel. Der $1/\mu^2 \cdot (1/T_1)_M$ -Wert des neutralen Cytochrom *c* liegt mit ca. 33 etwas niedriger als z.B. der des Wal-Mb. Möglicherweise hängt diese Differenz mit der unterschiedlichen Komplexstruktur des Eisens in beiden Hämoproteiden zusammen. Der Ligandenverband des Eisens im Cytochrom *c* enthält keine Wassermoleküle, hingegen sind die Methämoglobine und Metmyoglobine Aquoverbindungen. Während Ferricytochrom *c* bei Wasserentzug sein Spektrum nicht verändert, wandelt sich z.B. das Methämoglobinspektrum bei Wasserentfernung völlig um, es besitzt dann Parahämatincharakter, wie es auch das Ferricytochrom *c* typisch ist^{21,22}. Die Rücktitration eines Anhydro-Methämoglobins mit Wasser liefert das Ausgangsspektrum, wobei aus dem Verlauf der Titrationskurve geschlossen werden muss, dass sich pro prosthetische Gruppe insgesamt 4 Wassermoleküle an Porphyrinsystem und Eisen spektral aktiv binden²³. Bei den Aquostrukturen der Methämoglobine und Metmyoglobine dürfte ein Austausch von Ligandenwasser und Milieuwasser (direkt oder über die Hydrathülle des Proteins) möglich sein und auch erfolgen. Es ist denkbar, dass ein solcher Austausch an der Relaxations-Effektivität der Aquo-Ferrihämoproteide mit beteiligt ist und dann selbstverständlich in den "sterischen Anteil" eingeht. Beim neutralen Cytochrom *c* als Anhydro-Ferrihämoproteid ist diese Möglichkeit nicht vorhanden. Vermutlich liegt deshalb der $1/\mu^2 \cdot (1/T_1)_M$ Wert hierbei etwas niedriger. Da die Differenz (33 gegen 39) nicht sehr gross ist, sollte deshalb der direkte Austausch von Milieu- und Ligandenwasser an den Aquo-Ferrihämoproteiden für die sterische Komponente der Relaxations-Effektivität von geringer Wirkung sein als der geometrische Beitrag des minimalen Abstandes zwischen paramagnetischem Zentralion und Milieu- bzw. Hydrationswasser.

Eine Ergänzung dieses Problems wird durch das Verhalten des sauren Cytochrom *c* geliefert. Wie angeführt nimmt es bei pH < 2.5 spektral Methämoglobincharakter an¹⁷. In unveröffentlichten Versuchen konnten wir zeigen, dass dabei das Ferricytochrom *c* auch gegen Wasserentzug empfindlich wird. Saures Ferricytochrom *c* scheint somit auch ein Aquo-Ferrihämoproteid zu sein, bei dem nun ebenfalls, wie z.B. beim Metmyoglobin, ein Austausch von Liganden- und Milieuwasser möglich wäre. Vielleicht ist auf diesen Faktor der höhere $1/\mu^2 \cdot (1/T_1)_M$ -Wert des sauren gegenüber dem neutralen Cytochrom *c* zurückzuführen (37 gegen 33).

Die vergleichenden Betrachtungen der Häminkörper und Hämoproteide müssen jedoch noch durch Berücksichtigung der Elektronenrelaxationszeit dieser verschiedenen Verbindungen ergänzt werden; sie haben dann volle Gültigkeit, wenn die Differenzen der Elektronenrelaxationszeit miteinander verglichener Körper klein sind gegen die Differenzen der sterischen Faktoren. Die Untersuchungen müssen in dieser Richtung fortgesetzt werden.

Methämoglobinkomplexe

Um festzustellen, ob in den verschiedenen Pferdemethämoglobin-Komplexen bei der Ligandenbindung eine Veränderung der räumlichen Verhältnisse in der Umgebung der prosthetischen Gruppen erfolgt, prüften wir einige dieser Verbindungen mit unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe wurden tabellarisch erfasst (vgl. Tabelle V). Da bei den vorgelegten Ligandenkonzentrationen (meist 0.1 M) bei einigen Hb(III)-Verbindungen nur eine partielle Umwand-

lang in den Komplex erreicht wurde, erfolgte eine Korrektur des experimentell erhaltenen Wertes $1/(T_1 \cdot c)_{\text{exp.}}$ ($= b_{\text{exp.}}$) gemäss der Beziehung,

$$y = \frac{b_{\text{exp}} - b_{\text{Hb(III)}}}{b_{\text{Hb(III)}-L} - b_{\text{Hb(III)}}} \cdot 100$$

wobei y die auf Grund der Gleichgewichtskonstante ermittelte prozentuale Umwandlung in den Komplex, $b_{\text{Hb(III)}}$ der $1/(T_1 \cdot c)$ -Wert für Met.-äthämoglobin und $b_{\text{Hb(III)}-L}$ der gesuchte Wert für den Komplex sind.

Aus der Zusammenstellung ergeben sich einige Rückschlüsse. So schwächt sich bei Zugabe von 0.1 M KCl, das praktisch keine spektrale Veränderung der Lösung herbeiführt, die Fe-Milieu-Wechselwirkung ab, vorausgesetzt allerdings, dass der μ -Wert gleich gross ist wie für das salzfreie Methämoglobin (5.65). Entsprechend sind die Befunde bei Zugabe von KOCN und KSCN. Deutlich höher ist die Fe-Milieu-Wechselwirkung aber schon beim Formiat- und Azidkomplex. Besonders auffällig verhält sich Methämoglobinfluorid. Seine Effektivität auf die Protonenrelaxation des Wassers überschreitet bei weitem die vom magnetischen Moment her zu erklärende Komponente. Der sterische Anteil der Fe-Milieu-Wechselwirkung liegt um etwa eine Grössenordnung höher als bei den übrigen Komplexen. Die Ursachen für dieses abnorme Verhalten müssen weiter analysiert werden.

DANK

Herrn Professor H. PFEIFER, Physikalisches Institut der Karl-Marx-Universität, Leipzig, danke ich für die Durchführung der Relaxations-Messungen sowie für anregende Diskussionen.

ZUSAMMENFASSUNG

Hämin, Häminderivate und Ferrihämoproteide wurden in ihrer Wirksamkeit der Beeinflussung der kernmagnetischen Relaxation von Wasserprotonen untersucht. Es ergab sich folgende Reihenfolge: Neutrales Ferricytochrom c < Pferdemethämoglobin < Pferdemetmyoglobin < Chironomusmethämoglobin < saures Ferricytochrom c < Hämatin.

Die hohe Relaxations-Effektivität von freiem Hämatin wird bereits durch die adsorptive Bindung an ein präformiertes Makromolekül (PVP) erheblich eingeschränkt.

Die Relaxations-Effektivität der untersuchten paramagnetischen Stoffe wurde auf einen magnetischen und einen sterischen Anteil reduziert, wobei letzterer ein relatives Mass für die räumliche Zugänglichkeit der prosthetischen Gruppe in den Häminderivaten darstellt. Dabei zeigt sich, dass die Hämingruppen im Cytochrom c und im Chironomusmethämoglobin noch oberflächlicher angeordnet sein müssen als die des Pferdemetmyoglobins bzw. -methämoglobins.

Bei der Bindung von Liganden an das Pferdemethämoglobin wird der Einfluss des Eisens auf die Protonenrelaxation des Wassers nicht nur durch ein verändertes magnetisches Moment, sondern auch durch Veränderung der räumlichen Verhältnisse in der Umgebung der prosthetischen Gruppe bedingt. Besonders auffällig verhält sich dabei das Methämoglobinfluorid.

LITERATUR

- ¹ N. DAVIDSON UND R. GOLD, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 370.
- ² H. KON UND N. DAVIDSON, *J. Mol. Biol.*, 1 (1959) 190.
- ³ R. LUMRY, H. MATSUMIYA, F. A. BOVEY UND A. KOWALSKY, *J. Phys. Chem.*, 65 (1961) 837.
- ⁴ W. SCHELER, *Z. Physik. Chem. (Leipzig)*, 210 (1959) 61.
- ⁵ W. SCHELER UND I. FISCHBACH, *Acta Biol. Med. Ger.*, 4 (1960) 470.
- ⁶ H. THEORELL, *Biochem. Z.*, 252 (1932) 1.
- ⁷ W. SCHELER UND I. FISCHBACH, *Acta Biol. Med. Ger.*, 1 (1958) 194.
- ⁸ D. KEILIN UND E. F. HARTREE, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B, 122 (1937) 298.
- ⁹ M. SCHALFEJEFF, *Chem. Ber.*, 18 (1885) 232.
- ¹⁰ H. PFEIFER UND K.-H. WEISS, in A. LÖSCHE UND W. SCHÜTZ, *Hochfrequenzspektroskopie*, Akademie-Verlag, Berlin, 1961, S. 40 ff.
- ¹¹ A. WISHNIA, *J. Chem. Phys.*, 32 (1960) 871.
- ¹² J. F. GIBSON, D. J. E. INGRAM UND D. SCHONLAND, *Discussion Faraday Soc.*, 26 (1958) 72.
- ¹³ E. F. HARTREE, *Ann. Rept. Progr. Chem.*, 43 (1947) 287.
- ¹⁴ W. SCHELER UND I. FISCHBACH, *Biochem. Z.*, 332 (1960) 542.
- ¹⁵ H. THEORELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 1820.
- ¹⁶ W. SCHELER, G. SCHOFFA UND F. JUNG, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 232.
- ¹⁷ H. THEORELL UND A. ÅKESON, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 1812.
- ¹⁸ J. C. KENDREW, G. BODO, H. M. DINTZIS, R. G. PARRISH, H. WYCKOFF UND D. C. PHILLIPS, *Nature*, 181 (1958) 662.
- ¹⁹ J. C. KENDREW, R. E. DICKERSON, B. E. STRANDBERG, R. G. HART, D. E. DAVIES, D. C. PHILLIPS UND V. C. SHORE, *Nature*, 185 (1960) 422.
- ²⁰ W. SCHELER, *Acta Biol. Med. Ger.*, 4 (1960) 606.
- ²¹ D. KEILIN UND E. F. HARTREE, *Nature*, 170 (1952) 161.
- ²² W. SCHELER, G. SCHOFFA UND F. JUNG, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 83.
- ²³ W. SCHELER UND I. FISCHBACH, *Acta Biol. Med. Ger.*, 4 (1960) 470.
- ²⁴ H. PFEIFER, *Biochim. Biophys. Acta*, 66 (1963) 434.

Biochim. Biophys. Acta, 66 (1963) 424-433