

sec. Die Differenz der Meßwerte $1/T_2' - 1/T_1$ beträgt bei Benzol nur 0,003 und ist somit erheblich kleiner als bei vielen anderen Autoren.

Für $T_{1,2} > 1$ sec lassen sich die Messungen bei so kleinen H_1 -Werten durchführen, daß verschiedene Protonen bei chemischen Verschiebungen > 1 ppm getrennt untersucht werden können. Auch bei einer Wasserstoffkonzentration von 10^{-3} g/ml wird noch eine ausreichende Signalintensität erhalten. Aus den

gemessenen Relaxationszeiten T_2 ergeben sich natürliche Linienbreiten bis zu 10^{-2} Hz, die weit unterhalb der bei bester Magnetfeldhomogenität praktisch erreichbaren Werte liegen.

Herrn Professor Dr. G. V. SCHULZ und Herrn Professor Dr. G. MEYERHOFF danke ich für anregende Diskussionen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Sachmitteln.

Zur Deutung der kernmagnetischen Relaxation in Proteinlösungen *

R. KIMMICH und F. NOACK

Physikalisches Institut der Universität Stuttgart

(Z. Naturforsch. 25 a, 1680—1684 [1970]; eingegangen am 20. August 1970)

Measurements of longitudinal and transversal proton relaxation times in both H_2O and mixed H_2O/D_2O protein solutions show a low-frequency as well as a high-frequency dispersion of the longitudinal relaxation time and a nonexponential two-phase transversal relaxation. These results are discussed qualitatively in terms of "rigid" and "mobile" relaxation centers within the protein molecules.

1. Einführung

In einigen kürzlich veröffentlichten Arbeiten¹⁻⁴ wurde die Frequenzabhängigkeit der longitudinalen Protonenrelaxationszeit T_1 in wäßrigen Proteinlösungen untersucht. Das Auftreten zweier Dispersionsgebiete³, nämlich einer Tieffeld- bzw. Hochfelddispersion in (wegen der leichteren Nachweisbarkeit konzentrierten) Lösungen von Serumalbumin und Gelatine, warf dabei erneut die Frage auf, welche der drei Protonenphasen (Proteinprotonen, Protonen in der Hydrathülle und Protonen des ungebundenen Solvens) für das spezifische magnetische Relaxationsverhalten dieser Kernspinsysteme verantwortlich ist.

Nach einem Vorschlag von HENNEL und Mitarb.^{1,5} wird die Relaxationsrate der Wasserprotonen in Lösungen verschiedener Hühnereiproteine durch stark rotationsbehinderte, jedoch mit dem freien Lösungsmittel schnell gegenüber T_1 austau-

schende Wassermoleküle der Hydratschale⁶ bestimmt. Die Proteinprotonen selbst sollen eine nicht-beobachtbar kurze Relaxationszeit besitzen. Da eine derartige Rotationsbehinderung nur eine einfache T_1 -Dispersion erklärt, schlagen KOENIG und SCHILLINGER² zur Deutung der Hochfelddispersion (beobachtet an Apotransferrin in Wasser) ergänzend eine sterische Behinderung der Wassermoleküle in der Nähe der hydratisierten Proteinmoleküle vor. Als weiterführende Untersuchungen haben wir sowohl mit einem globulären wie mit einem fibrillären Protein zwei Experimente durchgeführt, die eine bessere Trennung der verschiedenen Phasen als die bisherigen Messungen erlauben und dadurch den Einbezug der Spindiffusion in die genannten Relaxationsmodelle erfordern. Diese Aufschlüsselung gelang *einerseits* mit Hilfe eines breitbandigen Kernresonanzimpulsspektrometers⁷, wodurch sichergestellt wurde, daß das Kernsignal sämtliche Protonenphasen erfaßt; und *andererseits* durch Beobachtung

Sonderdruckanforderungen an Dr. F. NOACK u. Dipl.-Phys. R. KIMMICH, Phys. Inst. der Universität Stuttgart, D-7000 Stuttgart, Wiederholdstraße 13.

* Auszugsweise vorgetragen auf der Physikertagung Darmstadt 1970 sowie auf der IV-th International Conference on NMR in Biological Systems in Oxford 1970.

¹ S. Blicharska, J. HENNEL u. Mitarb., BBA **207**, 381 [1970].

² S. H. KÖNIG u. W. E. SCHILLINGER, J. Biol. Chem. **244**, 3283 [1969].

³ R. KIMMICH u. F. NOACK, Z. Naturforsch. **25 a**, 299 [1970].

⁴ R. KIMMICH u. F. NOACK, Z. Angew. Phys. **29**, 248 [1970].

⁵ O. K. DASZKIEWICZ, J. W. HENNEL u. Mitarb., Nature London **200**, 1006 [1963].

⁶ J. ZIMMERMAN u. W. BRITTON, J. Phys. Chem. **61**, 1328 [1957].

⁷ U. HAEBERLEN, Kolloid-Z. und Z. Polymere **225**, 15 [1968]; Z. Angew. Phys. **23**, 341 [1967].

des Dispersionsverhaltens der Proteinprotonen selbst in (soweit wie aus Gründen der Nachweisempfindlichkeit möglich) deuterierten Lösungsmitteln.

2. Serumalbumin-Lösungen

2.1. Experimentelle Ergebnisse

Als Beispiel für globuläre Proteine wählten wir Serumalbumin vom Rind („reinst“; Hersteller: Behringwerke AG; elektrophoretischer Reinheitsgrad: 100%), das in entgastem destilliertem Wasser (H_2O -, D_2O - und H_2O/D_2O -Gemische, H_2O -Leitfähigkeit $< 0,1 \mu s$) gelöst wurde. Zur Vermeidung von Alterungserscheinungen mußten die Proben in Glasröhrchen mit möglichst kleinem Restgasvolumen versiegelt werden.

Das mit unserem breitbandigen Festkörper-Spektrometer⁷ (90° -Impuls: $2 \mu sec$; Totzeit: $5 \mu sec$; Larmor-Frequenzbereich: 4–86 MHz) aufgenommene transversale Kernsignal der Protonen dieser Lösungen setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: Neben dem überwiegenden Flüssigkeitssignal (FL) mit langem T_2 ($\approx 70 msec$ bei 44 MHz und $22^\circ C$) tritt eine Festkörper-Komponente (FK) mit kurzer Relaxationszeit ($T_2 \approx 60 \mu sec$ bei denselben Bedingungen) auf. Das FK-Signal läßt sich besonders deutlich in einer D_2O -Lösung nachweisen (Abb. 1). Die relative FK-Amplitude A_{FK}/A_{gesamt} steigt mit sinkender Temperatur stark an (Tab. 1), bleibt dabei jedoch im untersuchten Temperaturbereich stets kleiner als das Verhältnis der Protein- zur Gesamtprotonenzahl. Da das FK-Signal sicher von den Proteinmolekülen herrührt, muß demnach ein Teil der Proteinprotonen zum Flüssigkeitssignal beitragen und um so mehr dafür verantwortlich sein, je größer der D_2O -Gehalt des Lösungsmittels ist.

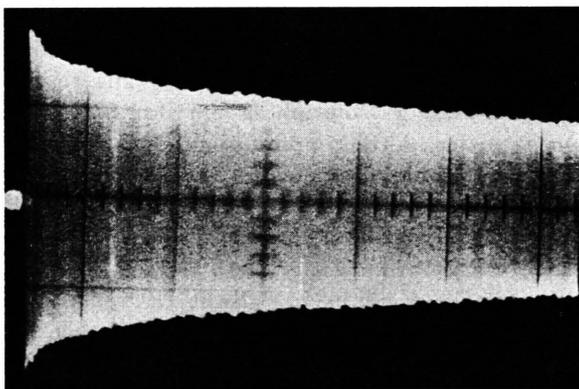


Abb. 1. Protonensignal einer Serumalbuminlösung in D_2O ($0,39 g$ Serumalbumin/ $cm^3 D_2O$); Protonenlarmorfrequenz: 44 MHz; Temperatur: $20^\circ C$; Zeitablenkung: $100 \mu sec/cm$; Probenalter: 1 h. Hersteller des Serumalbumins (vom Rind): Behringwerke.

Soweit es Nachweisempfindlichkeit und Auflösungsvermögen unseres Flüssigkeits-Spektrometers⁴ (Frequenzbereich 3 kHz bis 120 MHz) erlaubten, wurde die

Abhängigkeit der longitudinalen Protonenrelaxationszeit T_1 von der Larmor-Frequenz ν_p in ganz oder teilweise deuterierten Lösungen gemessen; und zwar sowohl für das gesamte Kernsignal (FK+FL) als auch für die Flüssigkeitskomponente (FL) allein. Die meßtechnischen Einzelheiten sind in⁴ beschrieben. Im Gegensatz zur transversalen ist die longitudinale Relaxation des Gesamtsignals (FK+FL) bei allen untersuchten Proben innerhalb der Meßgenauigkeit einfach ex-

Temperatur $^\circ C$	$A_{FK} : A_{ges}$ H_2O -Lösung	$A_{FK} : A_{ges}$ D_2O -Lösung
-5	0,12	0,45
0	0,08	—
15	—	0,21
30	0,03	0,13

Tab. 1. Relative Amplitude A_{FK}/A_{ges} der Festkörpersignalkomponente in Serumalbuminlösungen ($1 g$ Serumalbumin pro $2,56 cm^3$ Lösungsmittel, gemessen bei der Protonen-Larmor-Frequenz 44 MHz). Das Probenalter lag zwischen 1 h und 220 h, in diesem Zeitraum traten keine Alterungseffekte auf. Die Gesamtamplitude A_{ges} wurde $10 \mu sec$ nach dem Anfang des 90° -Impulses abgelesen und auf Impulsende extrapoliert.

ponentiell. Abbildung 2 verdeutlicht, daß eine mehr oder weniger starke Deuterierung der Proben den Verlauf der T_1 -Dispersion nur unwesentlich beeinflusst: Sowohl im Tieffeld- als auch im Hochfeldbereich bleibt eine Verlängerung der Relaxationszeiten gegenüber der nichtdeuterierten Lösung gemäß⁸ aus, was bei einer

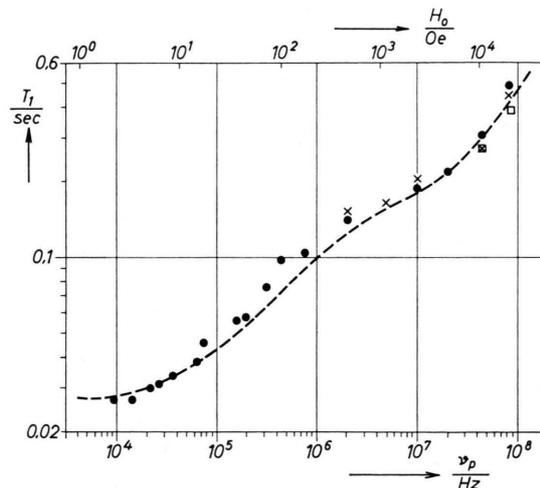


Abb. 2. Frequenzabhängigkeit der longitudinalen Relaxationszeit T_1 in wäßriger Lösung von Serumalbumin (SA). Konzentration: $0,39 g SA/cm^3$ Lösungsmittel; Temperatur: $0^\circ C$. ● SA in einer H_2O/D_2O -Mischung, 50 Vol.-% D_2O , FL-Signal; Probenalter: 1 h bis 1 Woche. × SA in D_2O , FL-Signal; Probenalter: 1 h. □ SA in D_2O , Gesamtsignal (FL+FK); Probenalter: 1 h. — — SA in H_2O (nach³).

⁸ W. A. ANDERSON u. J. T. ARNOLD, Phys. Rev. **101**, 511 [1956].

einzelnen Frequenz (14 MHz) an Hühnereiproteinen bereits früher von BLICHARSKA und Mitarbeitern¹ gefunden wurde. Nach⁹ und¹ bedeutet dies, daß der entscheidende Relaxationsprozeß innerhalb der Proteinmoleküle (intramolekulare Wechselwirkung) erfolgen muß. Insbesondere bestätigen die im Hochfeldbereich an reinen D₂O-Lösungen möglichen Messungen wegen des unveränderten Relaxationsverhaltens direkt, daß das Proteinmolekül selbst und nicht das Wasser für die Hochfelddispersion verantwortlich ist, denn hierbei sind die übrigen Protonenphasen „Hydrathülle“ und „ungebundenes Lösungsmittel“ praktisch nicht vorhanden und damit kernmagnetisch weitgehend relaxationsunwirksam.

Die geringfügigen Unterschiede zwischen den H₂O/D₂O-Gemischen und den H₂O-Lösungen (bis zu 15%) überraschen nicht. Verantwortlich für die kleine gegenüber den nicht deuterierten Proben auftretende Verschiebung der Dispersionskurve zu kleineren Frequenzen und etwas niedrigeren asymptotischen Endwerten $T_1(\nu_p)$, $\nu_p \rightarrow 0$ dürfte die größere Viskosität der D₂O-Lösungen sein, die sämtliche Bewegungen etwas verlangsamt. Nach¹⁰ ist das auf reines H₂O bezogene Viskositätsverhältnis einer 50-proz. H₂O/D₂O-Lösung bei 25 °C ca. 1,11, womit sich die beobachteten Abweichungen der T_1 -Werte gut erklären lassen.

2.2. Schlußfolgerungen

Die Tatsache, daß die longitudinale Relaxation des Gesamtsignals (FL + FK) bei allen Lösungen innerhalb der Meßgenauigkeit einfach exponentiell abläuft und daß zudem in deuterierten Proben die mögliche Trennung des FK- und Gesamtsignals auf nahezu gleiche Relaxationsraten führt (Abb. 2), rechtfertigt die Annahme, daß die nicht materiell austauschbaren, insbesondere die in der transversalen Magnetisierung als FK- bzw. FL-Signal getrennten Protonenphasen, longitudinal durch Spindiffusion ähnlich oder gleich relaxieren können. Auf Grund der unterschiedlichen Bindungsenergie der Protein- und Wasserprotonen wird innerhalb des Proteinmoleküls die Spindiffusion, in der Hydrathülle und im ungebundenen Lösungsmittel jedoch der materielle Protonenaustausch den Transport der Spins bestimmen, was zusammengenommen zu folgendem Modell für die molekularen Ursachen der Tief- bzw. Hochfelddispersion führt (Abb. 3): Wir leiten das Relaxationsverhalten des Gesamtsystems „Protein und Lösungsmittel“ von „Relaxationszentren“ ab, die nach Abschn. 2.1 im Proteinmolekül lokalisiert sein müssen. Da in unseren Lösungen zwei durch verschiedene Korrelationszeiten $\tau_i \approx 1/2\pi\nu_i$ (ν_i = mittlere Dispersionsfrequenz) charakterisierte

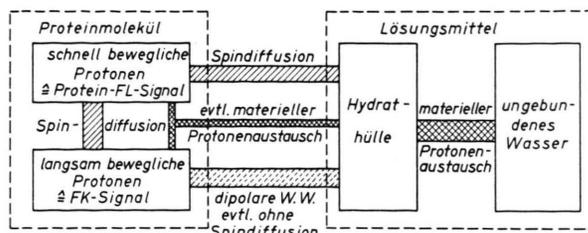


Abb. 3. Schematische Darstellung der Protonenrelaxation in Proteinlösungen durch materiellen Austausch und Spindiffusion. Die schnell bzw. langsam beweglichen Protonen des Proteinmoleküls wirken je nach Larmor-Frequenz als Relaxationszentren, an denen die Gesamtmagnetisierung im Hoch- bzw. Tieffeldbereich relaxiert. Der Transport der Spinorientierung erfolgt einerseits überwiegend materiell vom ungebundenen durch hydratisierten Wasser und andererseits vorwiegend durch Spindiffusion von der Hydrathülle sowie den je nach Feldstärke indirekt relaxierten Proteinprotonen an die jeweils effektiven „Zentren“. Offen bleibt an Hand der vorliegenden Messungen, ob die dipolare Wechselwirkung zwischen Hydrat- und FK-Protonen für eine Spindiffusion ausreicht. Die Hydratschale (und möglicherweise ein Teil der Proteinprotonen) tauscht mit den freien Wasserprotonen schnell gegenüber T_1 aus.

Dispersionsgebiete auftreten, müssen auch zwei unterschiedliche Relaxationszentren vorliegen³. Im Tieffeldbereich sind die starren Anteile des Proteinmoleküls, die weitgehend die Bewegung des Gesamt-moleküls ausführen, relaxationswirksam, so daß sich hier eine lange Korrelationszeit ergibt. Die kürzeren Korrelationszeiten rühren von relativ zum Gesamt-molekül beweglichen Seitengruppen oder Molekülteilen her (z. B. der rotationsbefähigten Ammoniumgruppe des Lysinsäurerestes) und führen zu der Dispersionsstufe im Hochfeldbereich. Im Übergangsbereich sind beide Zentren für die Gesamtrelaxation verantwortlich. Das Verhalten der jeweils relaxationswirksamen Protonenphase teilt sich allen übrigen Protonen durch Spindiffusion (innerhalb des Proteinmoleküls) sowie durch materiellen Protonenaustausch (im Lösungsmittel) mit. Der Kontakt zwischen Hydrat- und Proteinprotonen erfolgt durch dipolare Wechselwirkung und damit verknüpfter Spindiffusion. Die Möglichkeit, daß die Hydrathülle lediglich durch dipolare Wechselwirkung zwischen benachbarten Protein- und Hydratprotonen ohne Spindiffusion relaxiert wird¹, kann im Hochfeldbereich durch die einheitliche Relaxationszeit des Gesamtsignals bei allen Deuterierungsgraden ausgeschlossen werden. Im Tieffeldbereich ist dieser Nachweis wegen der größeren Totzeit nach den HF-Impulsen bei unserem Spektrometer z. Zt. nicht möglich.

⁹ D. MICHEL, Z. Naturforsch. **21 a**, 366 [1966].

¹⁰ G. JONES u. H. FORNWALT, J. Chem. Phys. **4**, 30 [1936].

Die indirekte Relaxation von Protonen durch Spindiffusion kann entweder durch die Spindiffusion selbst oder, wenn diese genügend rasch erfolgt, durch die Relaxationsrate der „Relaxationssenken“ begrenzt werden (diffusions- bzw. relaxationsbegrenzter Fall)¹¹; eine Diskussion dieser Grenzfälle für rein diamagnetische Substanzen findet man bei CONNOR¹² und HAEBERLEN¹³. Sie sind bequem unterscheidbar durch ihre stark differierende T_1 -Frequenzabhängigkeit, insbesondere an Hand des asymptotischen Verlaufs der Dispersionskurven bei hohen Frequenzen ($T_1 \sim \nu^{1/2}$ bzw. $T_1 \sim \nu^2$).

Die in Abb. 2 dargestellte Dispersionskurve läßt sich sowohl im Tief- wie im Hochfeldbereich mit dem Modell der diffusionsbegrenzten indirekten Relaxation beschreiben. Nach¹⁴ ist der mit diesem Typ verbundene, anfänglich nichtexponentielle Aufbau der longitudinalen Magnetisierung praktisch nicht beobachtbar, so daß sich kein Widerspruch zu dem gemessenen exponentiellen T_1 -Verhalten ergibt. Gegen den früher³ zur Erklärung der Frequenzabhängigkeit diskutierten relaxationsbegrenzten Fall in Verbindung mit einer Korrelationszeitverteilung spricht, daß in deuterierten Lösungen die dabei zu erwartende, vom Deuterierungsgrad abhängige Verkürzung der Relaxationszeiten (auf Grund der veränderten Protonenzahl pro Zentrum) gegenüber den H_2O -Lösungen ausbleibt¹².

Da bei der Tieffelddispersion an Hand der durchgeführten Experimente eine dipolare Wechselwirkung zwischen benachbarten Protein- und Hydratprotonen ohne Spindiffusion, jedoch in Verbindung mit einer Korrelationszeitverteilung, nicht ausschließbar ist, bleibt hier eine zweite, in¹ und² benützte Deutungsmöglichkeit offen. Diese Erklärung setzt allerdings voraus, daß die Aufenthaltsdauer der Wasserprotonen in der Hydrathülle größer als die Rotationsprungzeit des Proteinmoleküls ist. Zieht man zum Vergleich die Hydratation wäßriger Lösungen paramagnetischer Ionen heran, so wird diese Bedingung möglicherweise nicht oder nur für einen Teil der Hydratprotonen erfüllt.

Die Abschätzung der Korrelationszeiten des diffusionsbegrenzten Relaxationsmodells nach CONNOR¹² an Hand der Abb. 2 führt bei 0 °C auf

$$\tau_{\text{lang}} = 1,8 \cdot 10^{-6} \text{ sec} \quad \text{und} \quad \tau_{\text{kurz}} = 2,4 \cdot 10^{-9} \text{ sec}$$

¹¹ H. E. RORSCHACH, *Physica* **30**, 38 [1964].

¹² T. M. CONNOR, *Polymer* **7**, 426 [1966].

¹³ U. HAEBERLEN, *Polymer* **9**, 51 [1968].

¹⁴ E. FUKUSHIMA u. E. A. UEHLING, *Phys. Rev.* **173**, 366 [1968].

für den Tief- bzw. Hochfeldbereich**. Diese Zeiten liegen zwar über den Mittelwerten, jedoch innerhalb der Breite der in³ angepaßten Korrelationszeitverteilungen. Bedeutsam scheint uns der Hinweis, daß die (bezüglich der Frequenzabhängigkeit) gleichartige Statistik der Spindiffusion und Sprungzeitverteilung durch die Analyse deuterierter Proben unterscheidbar wird.

3. Ergebnisse bei Gelatinelösungen

Gelatine als Beispiel der fibrillären Proteine zeigt einige gegenüber Serumalbumin abweichende Ergebnisse. Sowohl das FK-Signal als auch die Tieffelddispersion von T_1 (Abb. 4) konnten nur im Gelzustand, d. h. unter 30 °C festgestellt werden. Daraus ist zu schließen, daß die in sich starren Helix-

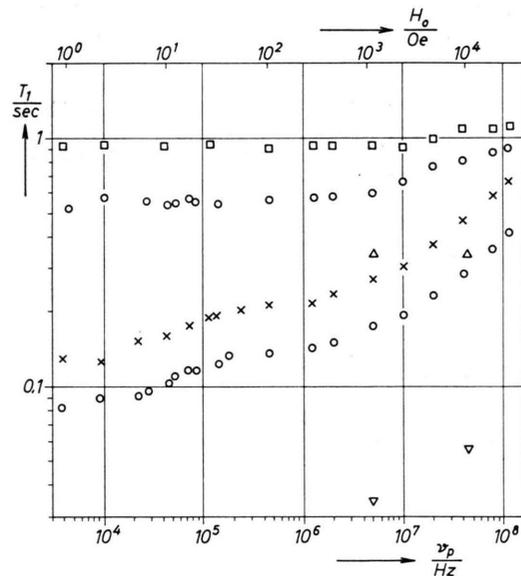


Abb. 4. Frequenzabhängigkeit der longitudinalen Relaxationszeit T_1 in wäßriger Lösung von Gelatine. Konzentration: 0,43 g Gelatine/cm³ Lösungsmittel; Hersteller der Gelatine („reinst“, DAB 6): Serva. — O, X, ●, □ Gelatine in H_2O bei 0, 15, 30 und 45 °C. Zur Homogenisierung wurden die Proben zunächst 2 Tage bei 70 °C getempert; die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Temperierdauer vor den Messungen 0,5 h. — Δ, ▽ Gelatine in D_2O , lange bzw. kurze T_1 -Komponente bei 0 °C. Probenalter ungefähr 2 Tage (bei 70 °C getempert); Temperierdauer vor den Messungen 0,5 h.

** Für die Abschätzung wurde $D \sim 1/T_2'$ ($T_2'^{-1}$ = Relaxationsrate für Flip-Flop-Prozesse) verwendet, d. h. die Diffusionskonstante ändert sich beim Durchlaufen eines Dispersionsgebietes um den Faktor 3/5.

Gebiete, in denen die Moleküle nach ¹⁵ die Gel-Ver-netzung bewirken, sowohl als Ursache der FK-Komponente als auch für die Tieffelddispersion verantwortlich gemacht werden sollten.

In D₂O-Lösungen wurde neben dem zweiphasigen transversalen auch ein nichtexponentieller longitudinaler Verlauf der Protonenrelaxation beobachtet, der sich aus der Überlagerung zweier Exponentialkurven mit den Zeitkonstanten T_1^{kurz} und T_1^{lang} aufbauen läßt. Die bei zwei Larmor-Frequenzen ($\nu_p = 5$ MHz und 44 MHz) durchgeführte Zerlegung der Relaxationskurven einer 2 Tage bei 70 °C getemperten Probe ergab im Vergleich zur Relaxationszeit $T_1(\text{H}_2\text{O})$ einer H₂O-Lösung entsprechender Konzentration einerseits eine frequenzabhängige kurze Komponente [$T_1^{\text{kurz}}(\text{D}_2\text{O}) \ll T_1(\text{H}_2\text{O})$] und andererseits eine praktisch frequenzunabhängige lange Komponente [$T_1^{\text{lang}}(\text{D}_2\text{O}) > T_1(\text{H}_2\text{O})$].

Offenbar bewirkt die Deuterierung der Lösungen eine weitgehende Entkopplung der direkt relaxierten Protonen in den Relaxationszentren mit kurzem T_1

und den durch materielle bzw. Spindiffusion indirekt relaxierten Protonen mit langem T_1 , wobei die kurzrelaxierende Phase der in D₂O gelösten Gelatine weitgehend dem Dispersionsverhalten der normalen H₂O-Lösung folgt. Die Entkopplung der beiden Phasen entspricht einem verkleinerten Spindiffusionskoeffizienten D , was wegen ¹⁶ $D \sim a^{-4} \eta^{-1}$ einer Vergrößerung der Viskosität η und des mittleren Protonenabstandes a durch Deuteroneneinbau gleichkommt. Ein derartiger Einbau ¹⁷ in das Proteinkmolekül wird durch einen T_1 verlängernden, sich über Tage erstreckenden Alterungsprozeß der D₂O-Gelatinelösungen nahegelegt.

Eine quantitative Diskussion dieser Ergebnisse ist in einer späteren Arbeit beabsichtigt.

Allen unseren Kollegen, insbesondere den Herren G. HELD, H. KOLB, G. PREISSING und J. v. SCHÜTZ, danken wir für ihre freundschaftliche Hilfe bei der Durchführung der Messungen und Herrn Prof. PILKUHNS für sein förderndes Interesse. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die zur Verfügung gestellten Sach- und Personalmittel.

¹⁵ F. H. VON HIPPEL, in: G. N. RAMACHANDRAN (Ed.), *Treatise on Collagen*, Academic Press, London 1967.

¹⁶ A. ABRAGAM, *The Principles of Nuclear Magnetism*, Clarendon Press, Oxford 1962.

¹⁷ R. B. MARTIN, *Introduction to Biophysical Chemistry*, McGraw-Hill, New York 1964, S. 245.