

## Kernmagnetische Relaxation in Proteinlösungen

R. KIMMICH und F. NOACK

I. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart

(Z. Naturforsch. 25 a, 299–301 [1970]; eingeg. am 24. Dezember 1969)

### a) Meßergebnisse

Zum Studium der Molekülbewegung in Biopolymeren wurde die magnetische Protonenrelaxationszeit  $T_1$  in einigen wäßrigen Proteinlösungen (Serum-Albumin vom Rind, Gelatine) über einen sehr großen Magnetfeld- bzw. Larmorfrequenzbereich (1 Oe bis  $3 \cdot 10^4$  Oe  $\approx 4 \cdot 10^3$  Hz bis  $1,2 \cdot 10^8$  Hz) bei verschiedenen Temperaturen und Konzentrationen gemessen. Dazu wurde ein früher beschriebenes Kernresonanz-Impulsspektrometer<sup>1</sup> mit einer für kurze  $T_1$ -Werte ( $\geq 5 \cdot 10^{-3}$  sec) und kleine Probenvolumina ( $\sim 15 \text{ cm}^3$ ) geeigneten Zweifeldmethode<sup>2</sup> auf den Tieffeldbereich erweitert.

Unsere Ergebnisse sind in der Abb. 1 zusammengefaßt: Das Auffallendste in diesem Diagramm ist die bis zu kleinen Frequenzen herab auftretende Dispersion der Relaxationszeiten, die den üblichen Vorstellungen

über das Einwirken der Makroviskosität auf Spinsysteme widerspricht. Die Abnahme von  $T_1$  mit sinkender Frequenz erfolgt ersichtlich in zwei Stufen, die im Beispiel der Gelatinelösungen (links) deutlich getrennt sind, während sie im Fall der Serum-Albuminlösungen (rechts) weitgehend ineinander greifen. Aus diesem Sachverhalt ist an Hand der bekannten Methoden der magnetischen Relaxationsspektroskopie<sup>3</sup> zu folgern, daß die Protonen der hydratisierten Proteinmoleküle zweierlei Bewegungsprozesse ausführen: Jede Dispersionsstufe ist danach mit einer molekularen Umorientierung verbunden, wobei das Produkt aus Sprungzeit  $\tau$  und mittlerer Dispersionsfrequenz  $\nu$  von der Größenordnung eins ist. In früheren dielektrischen<sup>4</sup> und magnetischen<sup>5</sup> Untersuchungen wurde bislang nur ein einziger Bewegungsprozeß diskutiert.

Wichtig scheint uns der Hinweis, daß die Relaxation im Rahmen der Meßgenauigkeit dennoch nur mit einer Zeitkonstanten, also einfach exponentiell abläuft. Wir schließen daraus, daß zwischen allen relaxierenden Protonen spins ein schneller Austausch im Zimmerman-Brittinschen<sup>6</sup> Sinne stattfindet, wodurch die beobachtete Relaxationsrate einen gewichteten Mittelwert darstellt.

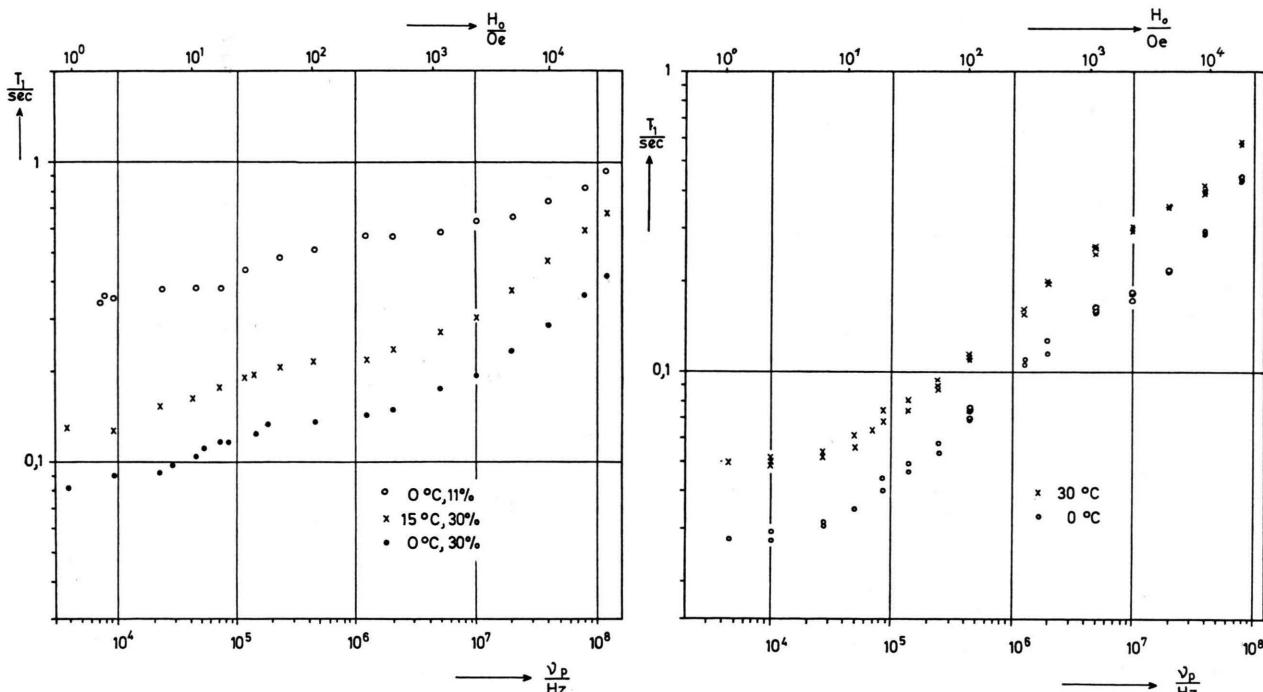


Abb. 1. Frequenz- bzw. Magnetfeldabhängigkeit der Protonenrelaxationszeit  $T_1$  in wäßrigen Lösungen von Serum-Albumin vom Rind (rechts; Konzentration  $C=28$  Gewichts-Proz.) und Gelatine (links; Konzentration  $C=11\%$  bzw.  $30\%$ ) bei verschiedenen Temperaturen. Das Serum-Albumin wurde von den Behring-Werken, die Gelatine von Serva bezogen.

Sonderdruckanforderungen an Dr. F. NOACK, I. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart, D-7000 Stuttgart N, Wiederholdstr. 13.

<sup>1</sup> R. HAUSSER u. F. NOACK, Z. Phys. **182**, 93 [1964].

<sup>2</sup> R. HAUSSER, H. KOLB u. G. SIEGLE, Z. angew. Phys. **22**, 375 [1967]. — R. KIMMICH u. F. NOACK, Z. angew. Phys., in Vorbereitung.

<sup>3</sup> A. ABRAGAM, The Principles of Nuclear Magnetism, Clarendon Press, Oxford 1962.

<sup>4</sup> E. COHN u. J. EDSALL, Proteins, Amino Acids and Peptides, Hafner Publ. Co., New York 1965.

<sup>5</sup> B. Blicharska, J. Hennel u. Mitarb., Zur Veröffentlichung in Biochimica et Biophysica Acta angenommen.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

## b) Deutung

Qualitativ deuten wir die Meßergebnisse durch dipolare Proton-Proton-Wechselwirkung zwischen sowie innerhalb der Protein- und Wassermoleküle. Grob betrachtet läßt sich dabei die Gesamtheit der Protonen in der Lösung in zwei Phasen I und II aufteilen, nämlich in die Protonen des freien, nichthydratisierten Wassers (I) und die Protonen der Proteinmoleküle samt deren Hydrathülle (II). Von der Phase I erwarten wir in unserem Fall keinen nennenswerten Relaxationsbeitrag, denn die Relaxationszeit des Wassers ( $T_{1,25}^{\circ}\text{C} = 3,7 \text{ sec}$ ) ist bei den hier verwendeten hohen Proteinkonzentrationen der Lösungen im Vergleich zu den Meßwerten in Abb. 1 vernachlässigbar. Die Phase II müßte dem komplexen Aufbau der Proteine entsprechend genau genommen in eine Vielzahl weiterer Unterphasen aufgeteilt werden. Zur Erklärung unserer Meßergebnisse betrachten wir jedoch zunächst nur solche Gruppen von Phasen, deren Protonen wesentlich verschiedene Diffusionskoeffizienten besitzen, d. h. wir beschränken uns auf die Unterscheidung von zwei Protonengruppen<sup>7-9</sup> (Abb. 2):

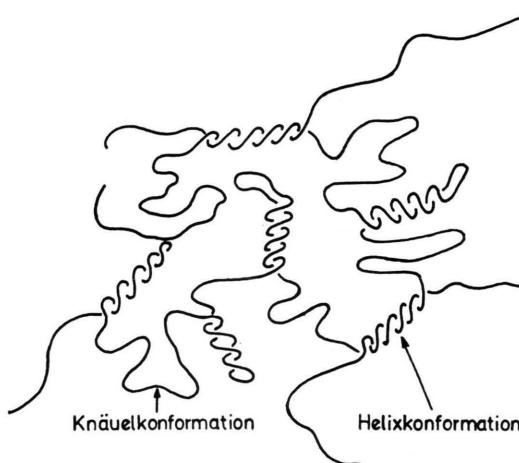


Abb. 2. Schematische Darstellung der Helix- und Knäuel-Bereiche in einer Gelatinelösung.

Protein	Konz./%	Temp./ $^{\circ}\text{C}$	$\alpha_1$	$\tau_1/\text{sec}$	$\alpha_2$	$\tau_2/\text{sec}$
Serumalbumin	28	0	0,46	$5,5 \cdot 10^{-8}$	2,0	$1,1 \cdot 10^{-9}$
Serumalbumin	28	30	0,46	$3,2 \cdot 10^{-8}$	2,0	$5,7 \cdot 10^{-10}$
Gelatine	30	0	0,34	$4,4 \cdot 10^{-9}$	0,6	$1,5 \cdot 10^{-10}$
Gelatine	30	15	0,34	$2,8 \cdot 10^{-9}$	0,6	$8,4 \cdot 10^{-11}$
Gelatine	11	0	0,38	$4,2 \cdot 10^{-9}$	—	—
Hühnereiweiß	10	20	0,34	$1,5 \cdot 10^{-9}$	—	—

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

<sup>7</sup> H. MORAWETZ, Macromolecules in Solution, Interscience Publ., New York 1965.

1. Protonen, die sich in den starren Bereichen der Proteine, also vorwiegend in den Helixanteilen befinden;
2. schneller bewegliche Protonen, die sich vorwiegend in den Knäuelanteilen und in der Hydrathülle aufhalten.

Der ersten Gruppe ordnen wir die langsame Bewegung zu, welche für die Tieffeld-Dispersionstufe verantwortlich ist. Das Hochfeld-Dispersionsgebiet resultiert aus der schnelleren Diffusion der zweiten Gruppe. In Übereinstimmung mit diesem Bild steht, daß die beiden Dispersionsgebiete in Gelatine- und Serum-Albuminlösungen verschieden gut aufgelöst sind. In Gelatine als faserförmigem Protein ist die Protonenbeweglichkeit sowohl in den Helix- wie in den Knäuelbereichen (vgl. Tab. 1) sicherlich größer als in den entsprechenden Regionen des globalen Serum-Albumins, da im ersten Fall rein geometrisch gesehen eine höhere Flexibilität zu erwarten ist.

Quantitativ läßt sich die beobachtete Frequenzabhängigkeit  $T_1(\nu)$  mit den gebräuchlichen Relaxationsformeln des Zweispin-Zweiphasenmodells (Hüpfmodell für isotrope statistische Fluktuationen der Spinverbindungsvektoren mit Debyeschem Intensitätsspektrum, schneller Austausch der Phasen) nur unbefriedigend erfassen. Aus<sup>3,6</sup>

$$\frac{1}{T_1 \text{ gesamt}} = \frac{W_1}{T_{1(1)}} + \frac{W_2}{T_{1(2)}} = C_1 \left\{ \frac{\tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} + \frac{2 \tau_1}{1 + 4 \omega^2 \tau_1^2} \right\} + C_2 \left\{ \frac{\tau_2}{1 + \omega^2 \tau_2^2} + \frac{2 \tau_2}{1 + 4 \omega^2 \tau_2^2} \right\} \quad (1)$$

[ $W_1$ ,  $W_2$  Bruchteil der Gesamt-Protonenzahl in den Phasen (1) bzw. (2),  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  Zugehörige Protonensprungzeiten,  $C_1$ ,  $C_2$  zugehörige Relaxationskonstanten;  $\omega = 2 \pi \nu = \gamma H_0$  Protonen-Larmorfrequenz,  $\gamma$  magnetogyrisches Verhältnis,  $H_0$  Zeeman-Feld] folgt eine gegenüber dem Experiment in beiden Beispielen zu steile Dispersion. Als mögliche Ursachen dafür kommen u. a. anistrope Rotationsbewegungen, translatorische Diffusionschritte und ganz allgemein (durch den komplexen Molekülbau bedingte) Sprungzeitverteilungen in Frage,

Tab. 1. Mittlere Sprungzeiten  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  der Protonenbewegung in den Helix- und Knäuelbereichen wäßriger Proteinlösungen nach Abb. 1 und Gl. (1) in Verbindung mit einer Log-Gauß-Verteilung  $g(\tau/\tau_i) = \alpha_i / \sqrt{\pi} \exp\{-(\alpha_i \ln \tau/\tau_i)^2\}$ ,  $i = 1$  bzw. 2,

mit dem Breitenparameter  $\alpha_i$ . Die Werte für Hühnereiweiß sind aus Ref. <sup>5</sup> entnommen.

<sup>8</sup> G. N. RAMACHANDRAN, Treatise on Collagen, Academic Press, London 1967.

<sup>9</sup> G. N. RAMACHANDRAN, Aspects of Protein Structure, Academic Press, London 1963.

<sup>10</sup> F. NOACK u. G. PREISSING, Z. Naturforsch. **24 a**, 143 [1969].

deren eindeutige Trennung jedoch Messungen an weiteren Proteinen voraussetzt.

Beispielsweise führt die Anpassung mit einer Log-Gauß-Sprungzeitverteilung<sup>5, 10</sup> näherungsweise zu den in Tab. 1 angegebenen mittleren  $\tau$ -Werten. Die aus dielektrischen Dämpfungsmessungen<sup>4</sup> bekannten Sprungzeiten sind allesamt länger und zeigen zudem nicht so große  $\tau_1/\tau_2$ -Verhältnisse (etwa 30 bis 50). Das Ausbleiben schnellerer Sprungzeiten im Falle der dielektrischen Relaxation führen wir darauf zurück, daß bei elektrischen, auf das Gesamtmolekül bezogenen Dipolumlagerungen in einem hydratisierten Protein Bewegungen von Teilbereichen weniger gut differenzierbar

sind als in magnetischen Spinsystemen: In großen Molekülen wie den Biopolymeren muß nicht jede Relativbewegung zweier Protonen, die magnetisch relaxierend wirkt, gleichzeitig das elektrische Dipolmoment ändern. Die beobachtete Verkürzung der Sprungzeiten mit steigender Temperatur bzw. abnehmender Proteinconzentration ist im Rahmen eines Arrhenius-Gesetzes verständlich.

Allen unseren Kollegen, insbesondere den Herren G. PREISING und G. HELD, danken wir für nützliche Ratschläge. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die zur Verfügung gestellten Sach- und Personalmittel.

## Die Dampfdruckkurve von $\text{In}_2\text{S}_3$

G. BOLLMANN und H. NELKOWSKI

II. Physikalisches Institut der Technischen Universität Berlin  
(Z. Naturforsch. 25 a, 301—302 [1970]; eingeg. am 27. Dezember 1969)

The temperature dependence of the  $\text{In}_2\text{S}_3$  vapour pressure was investigated by means of the effusion method using radioactive In-116. In the range from 900—1200 K the pressure is given by  $\log p = -1.118 \cdot 10^4/T + 9.23$ .

Die Kenntnis der Dampfdruckkurven wird u. a. in der Festkörperphysik für Untersuchungen der Diffusion aus der Gasphase benötigt. Derartige Daten sind jedoch für viele der zur Dotierung von Halbleitern und Leuchstoffen wichtigen Verbindungen nicht bekannt. Für die Untersuchung der Diffusion von In in  $\text{ZnS}$ <sup>1</sup> wurde deshalb mittels der Effusionsmethode<sup>2</sup> die Temperaturabhängigkeit des Dampfdrucks von  $\text{In}_2\text{S}_3$  bestimmt. Das dafür benutzte radiochemische Verfahren erwies sich als leicht durchführbar und lieferte sehr reproduzierbare Werte, deshalb sei es hier mitgeteilt.

Bekanntlich ist die Effusionsrate  $G = \Delta m/a \cdot t$ , d. h. die Masse  $\Delta m$ , die in der Zeit  $t$  durch eine Öffnung vom Querschnitt  $a$  ins Vakuum transportiert wird, dem Dampfdruck  $p$  proportional, solange die freie Weglänge groß ist gegen den Lochdurchmesser (Knudsen-Bedingung):

$$p = G (2 \pi R T/M)^{1/2} \propto . \quad (1)$$

Dabei ist  $R$  die Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $M$  das Molekulargewicht und  $\propto$  ein Formfaktor. Für Lochblenden hängt  $\propto$  nur vom Verhältnis des Lochdurchmessers zur Wandstärke der Blende ab, für diesen Fall wurde  $\propto$  von KENNARD<sup>3</sup> berechnet.

Abbildung 1 zeigt das Meßgefäß. Ein ca. 15 cm langes Quarzrohr von 8 mm Innendurchmesser ist in den Verdampfungsraum (links) und den Kondensationsraum (rechts) unterteilt. Das wurde dadurch erreicht, daß ein Quarzrohr einseitig zu einer Kapillare ausgezogen und diese so abgetrennt wurde, daß eine Öffnung

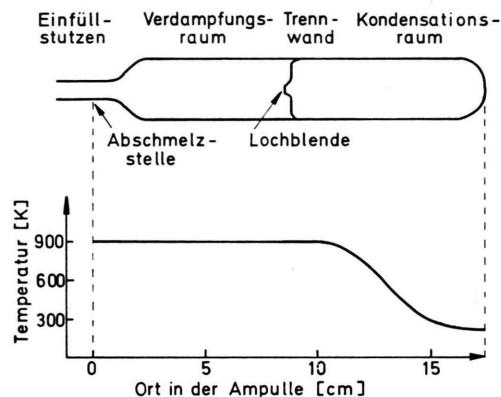


Abb. 1. Schematische Darstellung des Meßgefäßes und des Temperaturverlaufs.

von ca. 0,05 mm  $\varnothing$  entstand. Durch Stauchen dieses Endstückes und Anschmelzen eines zweiten Rohres, an dessen anderem Ende sich der Einfüllstutzen befindet, wurde die endgültige Form hergestellt. Nach dem Einfüllen der zu untersuchenden Substanz und sorgfältigem Evakuieren unter gründlichem Ausheizen wird das Versuchsgefäß abgeschmolzen.

In der Abbildung ist auch die Temperaturverteilung während der Effusionsmessung skizziert. Der Verdampfungsraum befindet sich auf der Temperatur, für welche der Dampfdruck bestimmt werden soll. Die Temperatur des äußeren Endes des Kondensationsraumes wird dabei so niedrig gehalten, daß eine Rückdiffusion in den Verdampfungsraum vernachlässigt werden kann.

Für die Untersuchung wurde  $\text{In}_2\text{S}_3$  benutzt, welches durch Neutronenbestrahlung aktiviert worden war. (Aktives Isotop: In-116, Halbwertszeit 54,2 min.) Dadurch konnte die Bestimmung der transportierten Masse auf eine Aktivitätsmessung zurückgeführt werden. Die Nachweisgrenze von ca.  $10^{-12}$  g  $\text{In}_2\text{S}_3$  war dabei durch den Neutronenfluß des für die Aktivierung benutzten

<sup>2</sup> R. SPEISER u. H. L. JOHNSTON, Trans. A.I.M. 42, 283 [1950].

<sup>3</sup> E. H. KENNARD, Kinetic Theory of Gases, McGraw-Hill, New York 1938.

Sonderdruckanforderungen erbeten an Dr. H. NELKOWSKI, II. Physikalisches Institut der Technischen Universität Berlin, D-1000 Berlin 12, Straße des 17. Juni 135.

<sup>1</sup> H. NELKOWSKI u. G. BOLLMANN, Z. Naturforsch. 24 a, 1302 [1969].