

## **<sup>31</sup>P-Resonanzen im Kernspinresonanzspektrum**

**P. Rösch und R. S. Goody**

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Biophysik,  
Jahnstrasse 29, D-6900 Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland

Liebe Kollegen,

es seien uns ein paar Anmerkungen zum Artikel von W. D. Keidel et al. in Nr. 184/1 (1984) Ihrer Zeitschrift erlaubt, in dem aus <sup>31</sup>P-NMR Untersuchungen auf das Vorhandensein von AP<sub>4</sub> in Muskelzellen geschlossen wird:

<sup>31</sup>P-NMR Spektren von Nukleotiden bestehen oberhalb des pK-Bereiches – ca. pH 6,5 im metallfreien, weniger als pH 6 im metallgebundenen Zustand – im wesentlichen aus einer Resonanz pro Phosphoratom (die wieder durch P-P- bzw. H-P-Kopplung weitere Struktur zeigen). Diese Resonanzen sind im allgemeinen auch bei kleineren Magnetfeldstärken gut trennbar, insbesondere lässt sich bei den metallfreien Triphosphaten die  $\beta$ -Resonanz bei ca. –20 ppm gut von der  $\alpha$ -Resonanz bei ca. –11 ppm und der  $\gamma$ -Resonanz bei ca. –6 ppm trennen (ppm von 85%igem H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Im metallgebundenen Zustand verschiebt sich die  $\beta$ -Resonanz zu positiveren ppm-Werten. Unterhalb des pK-Bereiches sind bei niedrigen Feldstärken die  $\alpha$ -Resonanz und die  $\gamma$ -Resonanz nicht mehr zu trennen; dies gilt für die metallfreie wie für die metallgebundene Form.

Ähnliches ist für das Tetraphosphat AP<sub>4</sub> zu erwarten: Eine Resonanz ( $\delta$ ) bei –6 ppm, eine ( $\alpha$ ) bei –11 ppm, und zwei ( $\beta$  und  $\gamma$ ) jenseits von –20 ppm im metallfreien System oberhalb des pK-Wertes; Verschiebungen durch Metallbindung sollten analog denjenigen bei Triphosphaten stattfinden. Dieses Verhalten wird in von uns durchgeführten Experimenten in der Tat beobachtet. Die pK-Werte sollten in ähnlichen Bereichen wie die der Triphosphate liegen.

Hieraus folgend möchten wir in Bezug auf die Veröffentlichung feststellen:

1. In pH-Bereichen, in denen die Autoren drei Resonanzen für ATP sehen, sollten sie mindestens ebensoviele für AP<sub>4</sub> sehen – unabhängig von der Spektrometerfrequenz und den Meßbedingungen.
2. Ein Vergleichsspektrum von AP<sub>4</sub> im oder unterhalb des pK-Bereiches im metallfreien Zustand ist nicht geeignet als Vergleichsspektrum für diese Substanz oberhalb dieses Bereichs, schon gar nicht, wenn Metalle in der Lösung anwesend sind. (In Abb. 3 wird das Skelettmuskelspektrum mit metallfreiem ATP bei pH 7 verglichen, in Abb. 5 dasselbe Spektrum mit metallfreiem AP<sub>4</sub> bei pH 6,5.)

3. Das veröffentlichte Vergleichsspektrum (Abb. 5c) hat unseres Erachtens sehr viel mehr Ähnlichkeit mit dem für AP<sub>4</sub>A zu erwartenden Spektrum als mit dem von AP<sub>4</sub>.

Es sei betont, daß diese Punkte nicht notwendig dem Vorhandensein von AP<sub>4</sub> in den vermuteten Konzentrationen im Muskel widersprechen. Es ist sehr leicht möglich, daß in einigen Spektren die  $\alpha$ -Resonanz von AP<sub>4</sub> mit der  $\alpha$ -Resonanz von ATP überlappt, die  $\beta$ -Resonanz von AP<sub>4</sub> mit der  $\beta$ -Resonanz von ATP. Dies ist auf Grund der nur grob bestimmbarer Intensitätsverteilung in den gezeigten Spektren nicht ohne weiteres auszuschließen.

Zur Klärung des Problems wird <sup>1</sup>H-NMR nicht weiter helfen, da die Protonenspektren aller Adenosinphosphate praktisch identisch sind. Ähnliches gilt für <sup>13</sup>C-NMR, wobei hier noch die geringe Empfindlichkeit von <sup>13</sup>C in natürlicher Häufigkeit hinzukommt.

Wir schlagen deshalb vor, das <sup>31</sup>P-NMR Spektrum mit Hilfe von Phosphor-Phosphor Doppelresonanz bei höheren Magnetfeldstärken genauer zu untersuchen.

Ebenso sei an dieser Stelle an andere Verfahren der Biochemie, etwa Chromatographie mit HPLC, erinnert. Da nach unseren Erfahrungen die Stabilität von ATP und AP<sub>4</sub> auch im saueren Bereich sehr ähnlich ist, sollte die Identifikation von AP<sub>4</sub> mit HPLC einfach und sicher möglich sein.

Paul Rösch Roger S. Goody

Received January 24, 1984

## Abschließender Kommentar

### W. D. Keidel, V. Reiman

Institut für Physiologie und Biokybernetik, Universität Erlangen-Nürnberg,  
Universitätsstrasse 17, D-8520 Erlangen, Bundesrepublik Deutschland

Zur Klärung der in der Leserzuschrift vom 24.1.84 angeführten Punkte ist folgendes zu bemerken:

Zu 1.

Durch Verwendung dünner, rotierender Probenröhrchen (<10 mm) und Protonenentkopplung läßt sich die Auflösung des von uns verwendeten BRUKER-Spektrometers soweit erhöhen, daß im NMR-Spektrum des AP<sub>4</sub> die zwei Spektralliniengruppen als vier Linien ( $\delta$ ,  $\alpha$  und  $\gamma$ ,  $\beta$ ) beobachtet werden können. Diese sind durch P-P-Koppelung noch weiter aufgespalten (Abb. 1g). Für einen direkten Vergleich der Spektren verschiedener Nukleotidpolyphosphate mit den Spektren des Herz- und Skelettmuskels ist es jedoch notwendig, unter den glei-

chen Bedingungen wie im Gewebe zu messen, also großer Probendurchmesser ( $\geq 10$  mm), ohne Rotation, sowie zusätzlicher Linienvorbreiterung durch Protonenkoppelung und Rauschunterdrückung. Dadurch wird die Auflösung soweit verringert, daß bei pH-Werten  $< 6.0$

bei einem  $AP_4$ -Vergleichsspektrum nur *zwei Linien*, und zwar rechts von der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Linie des MgATP zu sehen sind. Diese verschieben sich bei weiter fallendem pH nach rechts und stimmen dann noch besser mit den zu identifizierenden Resonanzen des Muskelgewebes überein (Abb. 1d). Ein solcher Fall ist auch in Abb. 5c der Arbeit dargestellt.

Bei pH-Werten  $> 6.0$

werden *drei Linien* ( $\delta$ ,  $\alpha$  und  $\gamma\beta$ ) aufgelöst (Abb. 1c). Dabei liegt aber die  $\delta$ -Linie im Bereich zwischen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Resonanz des MgATP. Dies hat zur Folge, daß wegen der geringen  $AP_4$ -Konzentration und der großen Linienbreiten, die im Gewebe gemessen werden, die  $\delta$ -Resonanz im Muskelspektrum nicht identifizierbar ist.

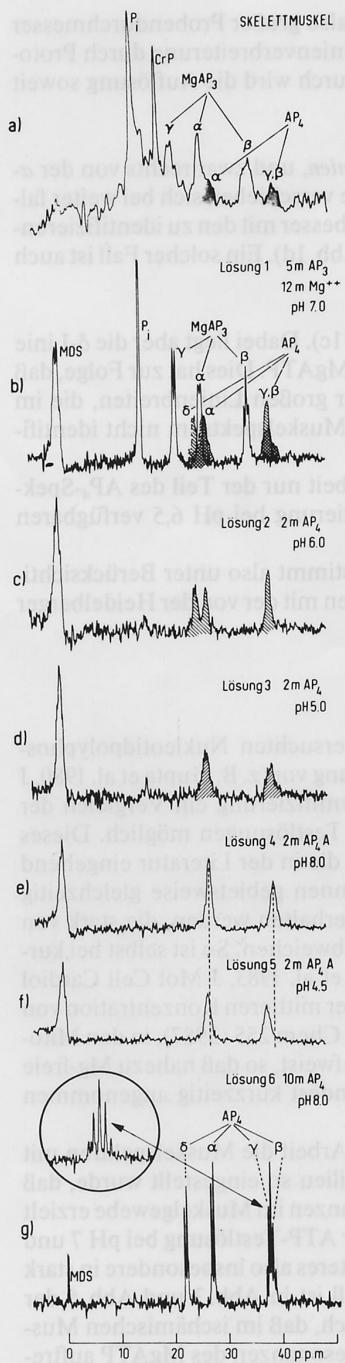
Aus diesem Grund wurde in Abb. 4a der Arbeit nur der Teil des  $AP_4$ -Spektrums eingezeichnet, der die zwei zur Identifizierung bei pH 6,5 verfügbaren Spektrallinien ( $\alpha$  und  $\gamma\beta$ ) enthält.

Die Zahl der von uns beobachteten Linien stimmt also unter Berücksichtigung der im Gewebe vorliegenden Besonderheiten mit der von der Heidelberger Gruppe gemessenen überein.

## Zu 2.

Im ischämischen Gewebe liegen zwar die untersuchten Nukleotidpolyphosphate zum größten Teil als Mg-Komplexverbindung vor (z. B. Gupta et al. 1980, J Biol Chem 255: 3987), dennoch ist zu ihrer Identifizierung ein Vergleich der Muskelspektren mit metallfreien, stark saueren Testlösungen möglich. Dieses Vorgehen ist zellphysiologisch begründet durch die in der Literatur eingehend beschriebene *Compartmentierung*. Durch sie können gebietsweise gleichzeitig sehr hohe Konzentrationsunterschiede aufrechterhalten werden, die stark von den über die gesamte Zelle gemittelten Werten abweichen. So ist selbst bei kurzer Ischämie ein  $\Delta$ pH von 1,5 möglich (Brooks et al. 1983, J Mol Cell Cardiol 15: 495). Ähnliches gilt für das freie Mg, das in einer mittleren Konzentration von nur 0,6 mM vorliegt (z. B. Gupta et al. 1980, J Biol Chem 255: 3987), in den Mitochondrien jedoch eine erhöhte Konzentration aufweist, so daß nahezu Mg-freie Compartmente mit einem  $\Delta$ pH von ca. 2 zumindest kurzzeitig angenommen werden müssen.

Aus den genannten Gründen wurden in der Arbeit die Muskelspektren mit Testspektren verglichen, bei denen das Ionenmilieu so eingestellt wurde, daß größtmögliche Übereinstimmung mit den Resonanzen im Muskelgewebe erzielt wurde; und zwar ergibt sich diese bei metallfreier ATP-Testlösung bei pH 7 und bei metallfreier  $AP_4$ -Testlösung bei pH  $\leq 6,6$  (letzteres also insbesondere in stark saurerer Umgebung, z. B. bei pH 5,0). Dieser Fall ist in Abb. 3 und Abb. 5 der Arbeit dargestellt. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß im ischämischen Muskelgewebe die unbekannten, rechts neben den Resonanzen des MgATP auftre-



**Abb. 1. a**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Skelettmuskels. Es sind die Phosphorresonanzen für anorganisches Phosphat (P), Kreatinphosphat (CrP), die drei Phosphatgruppen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) der Mg-Komplexbindung des Adenosintriphosphats ( $\text{MgAP}_3$ ) und zwei Linien ( $\alpha$ ,  $\gamma$ - $\beta$ ) des metallfreien Adenosintetraphosphats ( $\text{AP}_4$ ) zu erkennen. **b** Lösung 1 enthält 10 mM P, 5 mM  $\text{AP}_3$ , 12 mM  $\text{Mg}^{++}$ . Als externer Standard dient methylendiphosphorige Säure (MDP). Es bildet sich der Komplex  $\text{MgAP}$ , dessen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Resonanzen im gleichen Bereich liegen wie die entsprechenden Linien des  $\text{AP}_3$  im Gewebe. Zusätzlich sind die Resonanzen einer metallfreien  $\text{AP}_4$ -Lösung bei pH 6,0 und 5,0 schraffiert mit eingezzeichnet. Dies soll die im Gewebe vorliegende Compartmentierung veranschaulichen. Die  $\alpha$ -Linie und die  $\beta$ - $\gamma$ -Linie des metallfreien  $\text{AP}_4$  stimmen mit den im Gewebe beobachteten zusätzlichen Resonanzen überein. Die  $\delta$ -Linie, die bei einem pH > 6,0 von der  $\alpha$ -Linie getrennt ist, liegt zwischen der  $\alpha$ - $\text{MgAP}_3$  und der  $\gamma$ - $\text{MgAP}_3$ -Linie und kann im Gewebe wegen der großen Linienbreite nicht beobachtet werden. **c** Lösung 2 enthält 2 mM metallfreies  $\text{AP}_4$  bei pH 6,0. Bei pH > 6,0 werden unter den gleichen Meßbedingungen wie im Gewebe drei Linien aufgelöst, und zwar  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\gamma$ - $\beta$ , wovon die  $\alpha$ -Linie und die  $\gamma$ - $\beta$ -Linie mit den zusätzlichen Resonanzen im Gewebe übereinstimmen. **d** Lösung 3 enthält 2 mM metallfreies  $\text{AP}_4$  bei pH 5,0. Bei pH < 6,0 werden unter den gleichen Meßbedingungen wie im Gewebe nur zwei Linien  $\alpha$ - $\delta$  und  $\gamma$ - $\beta$  aufgelöst, die (im Vergleich zu c) geringfügig nach rechts verschoben sind und damit noch besser mit den zusätzlichen Resonanzen im Gewebe übereinstimmen. **e** Lösung 4 enthält 2 mM metallfreies  $\text{AP}_4A$  bei pH 8,0. Die beiden Linien stimmen mit den zusätzlichen Resonanzen im Gewebe überein. **f** Lösung 5 enthält 2 mM metallfreies  $\text{AP}_4A$  bei pH 4,5. Bei niedrigen pH-Werten verschieben sich die Resonanzen des  $\text{AP}_4A$  nach links und stimmen nicht mehr mit den zusätzlichen Resonanzen im Gewebe überein (gestrichelte Linien). **g** Lösung 6 enthält 10 mM metallfreies  $\text{AP}_4$  bei pH 8,0. Die Meßbedingungen wurden hier, was bei Untersuchungen im Gewebe nicht möglich ist, so gewählt, daß größtmögliche Auflösung erzielt wurde. Dann können vier Linien ( $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ) beobachtet werden. Diese sind durch die P-P-Koppelung weiter aufgespalten, so daß die  $\delta$ - und die  $\alpha$ -Linie als Dublett erscheinen, während die  $\gamma$ - und die  $\beta$ -Linie zwei Triplets bilden, die sich so überlagern, daß eine fünffache Aufspaltung entsteht.

tenden Linien durch metallfreie Compartmente von AP<sub>4</sub> bei niedrigem pH verursacht werden.

Allerdings ist im Gewebe ein Überlappen der  $\beta$ -Resonanz von AP<sub>4</sub> mit der  $\beta$ -Resonanz von ATP, wie es die Heidelberger Gruppe *in vitro* mißt, nicht möglich, da das ATP im Gewebe als MgATP-Komplex vorliegt und die  $\beta$ -Linie des komplexen ATP im betrachteten pH-Bereich nicht mit der  $\beta$ -Linie des AP<sub>4</sub> zusammenfällt (Abb. 1a, b, c, d).

### Zu 3.

Zunächst ist zu beachten, daß bei Verwendung von 85%igem H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> als Standard die in Elektromagneten gemessenen Spektren geringfügig von den in supraleitenden Magneten gemessenen abweichen (Burt et al. 1976, J Biol Chem 251: 2584). Nur bei Verwendung von Substanzen unveränderlicher magnetischer Suszeptibilität, wie z. B. methylendiphosphorige Säure als Standard, sind die in verschiedenen Magnettypen gewonnenen Spektren vergleichbar.

Weiter ist zu bemerken: Das Spektrum einer AP<sub>4</sub>A-Testlösung zeigt unter den angegebenen Bedingungen ebenfalls zwei Linien. Bei hohem pH besitzt das Spektrum von AP<sub>4</sub>A tatsächlich große Ähnlichkeit mit dem Spektrum einer AP<sub>4</sub>-Lösung bei niedrigem pH (Abb. 1e, d). Bei niedrigem pH liegen die Linien des AP<sub>4</sub>-Spektrums jedoch links von den zu identifizierenden Resonanzen im Gewebe (Abb. 1f). Da im ischämischen Muskelgewebe eine starke Säuerung, d.h. ein niedriger pH, anzunehmen ist, muß AP<sub>4</sub> und nicht AP<sub>4</sub>A als möglicher Verursacher der zusätzlichen Resonanzen im Gewebe angesehen werden; dementsprechend ist in Abb. 5c der Arbeit nicht etwa ein AP<sub>4</sub>A-, sondern ein AP<sub>4</sub>-Spektrum, und zwar bei niedrigem pH, abgebildet!

### Zu Doppelresonanzexperimente.

Doppelresonanzexperimente werden bei der am BRUKER HX 90-Spektrometer gegebenen Magnetfeldstärke von 2,4 T nicht bei der Klärung des Problems weiterhelfen, da eine Identifizierung des AP<sub>4</sub> auf Grund seiner Feinstruktur (-Veränderung) im NMR-Spektrum im Gewebe wegen der sehr großen Linienbreiten nicht möglich ist; selbst bei *in vitro*-Messungen, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden wie Untersuchungen am Gewebe, verschwindet die Feinstruktur weitgehend, wie ein Vergleich der Abb. 1g mit der Abb. 1c bestätigt.

Daher erscheint uns nach wie vor eine Identifizierung mittels Vergleichsspektren von Testlösungen sowohl mit Phosphor als auch mit Resonanzen anderer Kerne an unserer Anlage am erfolgversprechendsten. Welcher der möglichen Wege letztendlich zum Ziel führt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen und sollten auch erst dann diskutiert werden.

Im ganzen ist zu sagen, daß deutlich zu erkennen ist, daß die angesprochenen Einwände von einem Forscherteam gemacht wurden, das sicher sehr große Erfahrung auf dem Gebiet der *in vitro*-NMR-Spektroskopie besitzt, sich jedoch nicht an den physiologischen Gegebenheiten, die im lebenden Gewebe vorliegen, orientiert.

Viktor Reiman

Received April 2, 1984