

Denaturierung von Proteinen durch ionische Flüssigkeiten und Hofmeister-Reihe: eine Fallstudie wässriger Lösungen von Ribonuclease A**

Diana Constantinescu, Hermann Weingärtner* und Christian Herrmann

Viele Synthesen in Labor und Technik machen sich biokatalytische Reaktionen zunutze. Während die Natur Biokatalysatoren in wässriger Umgebung optimiert hat, können Eigenschaften wie die Selektivität einer Reaktion oder die Stabilität eines Substrats durch eine Variation des Lösungsmittels oft deutlich verbessert werden. In diesem Zusammenhang sind bei Raumtemperatur geschmolzene Salze (ionische Flüssigkeiten) von zunehmendem Interesse als Cosolventien für Wasser,^[1] in Zweiphasensystemen^[1] oder als reine Lösungsmittel.^[1,2] Ionische Flüssigkeiten bestehen aus organischen Kationen, z. B. alkylsubstituierten Imidazolium-, Pyrrolidinium- oder Tetraalkylammoniumionen, die mit vielen weiter unten erwähnten Anionen kombiniert werden können. Für eine Zusammenstellung wichtiger Kationen- und Anionenfamilien sei auf einen Übersichtsartikel von Forsyth et al. verwiesen.^[3]

Angesichts der zunehmenden Bedeutung ionischer Flüssigkeiten ist es wünschenswert, die Auswirkungen der Ionen auf Enzymeigenschaften wie Stabilität, Aktivität und Enantioselektivität systematisch zu charakterisieren. In wässrigen Lösungen einfacher Salze werden solche Salzeffekte seit langem untersucht, da biologische Prozesse oft bei vergleichsweise hohen Salzkonzentrationen ablaufen. Aus der phänomenologischen Beschreibung der Salzeffekte ergibt sich die so genannte Hofmeister-Reihe, die auf eine Untersuchung von Hofmeister zur salzinduzierten Ausfällung von Proteinen aus Hühnereiweiß Ende des 19. Jahrhunderts zurückgeht.^[4] Die Reihe spiegelt ursprünglich die Fähigkeit der Ionen wider, den nativen Zustand von Proteinen zu stabilisieren/destabilisieren,^[5] jedoch werden auch andere Kriterien, z. B. Auswirkungen auf die Enzymaktivität, zur Reihung der Ionen herangezogen.^[6,7] Zusätzlich ist dieses Konzept in vielen anderen Gebieten verbreitet, z. B. in der Kolloid-, Polymer- und Oberflächenchemie.^[6] Obwohl die Effekte in einigen Fällen auf spezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Ionen zurückführbar sind, weist das bei vielen Phänomenen beobachtete universelle Verhalten dieser Reihe auf eine allgemeinere Grundlage hin.^[6] Eine mögliche Er-

klärung schreibt die beobachteten Effekte den durch die Ionen induzierten Änderungen der Wasserstruktur zu, die die Bindung der Ionen an die Proteinoberfläche begünstigen oder den Ausschluss der Ionen von der Oberfläche bedingen.^[8]

Bisher wurde die Hofmeister-Reihe vor allem für anorganische Salze aufgestellt. Im Fall organischer Salze beschränken sich die Kenntnisse im Wesentlichen auf Tetraalkylammonium- und Guanidiniumverbindungen.^[6,9] Wegen der zunehmenden Bedeutung von ionischen Flüssigkeiten in der Biokatalyse sind die Charakterisierung und das Verstehen von Salzeffekten auch für komplexere Ionen wünschenswert, da dies die Vorhersage von Salzeffekten auf vielzählige Enzymeigenschaften ermöglichen sollte. Gegenwärtig sind über Effekte der in ionischen Flüssigkeiten auftretenden komplexeren Ionen nur rudimentäre Kenntnisse vorhanden.^[7]

In der vorliegenden Untersuchung wird die dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry, DSC) verwendet, um die Auswirkungen ionischer Flüssigkeiten auf die thermische Denaturierung des Enzyms Ribonuclease A (RNase A) bei ca. 60 °C zu untersuchen. Diese Experimente erfüllen zwei wichtige Kriterien für eine repräsentative Fallstudie: Erstens ist die thermische Stabilität von Proteinen der wichtigste Indikator für die Hofmeister-Reihe.^[6] Zweitens wurde RNase A in zahlreichen Untersuchungen zur Stabilität und Hydratation von Proteinen als prototypisches Enzym eingesetzt.^[6,8,9] Insbesondere setzten von Hippel und Wong die RNase A in einer grundlegenden Untersuchung der Salzeffekte auf die thermische Stabilität von Proteinen ein.^[9] Sie demonstrierten, dass je nach Ionenkombination einfache Salze die Temperatur T_m des Denaturierungsübergangs kontinuierlich zu höheren oder tieferen Werten verschieben können und so den thermisch stabilen Bereich vergrößern oder verringern. Da die Beiträge der Kationen und Anionen näherungsweise additiv sind, ist es möglich, voneinander unabhängige Kationen- und Anionenreihen zu bilden. Nach einer Korrektur der in Lit. [9] angegebenen Übergangstemperaturen T_m um 2 °C können diese mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Werten in Beziehung gesetzt werden.

Da Verschiebungen von T_m erst bei Salzkonzentrationen über $c = 0.1 \text{ M}$ ausreichend genau nachweisbar werden, konnten in dieser Untersuchung nur Salze verwendet werden, die vollständig mit Wasser mischbar sind. Zusätzlich zu einfachen anorganischen Ionen werden folgende Kationen betrachtet: 1-Ethyl-3-methylimidazolium ($[\text{emim}]^+$), 1-Butyl-3-methylimidazolium, ($[\text{bmim}]^+$), 1-Hexyl-3-methylimidazolium ($[\text{C}_6\text{mim}]^+$), 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium ($[\text{bmpyr}]^+$),

[*] D. Constantinescu, Prof. Dr. H. Weingärtner, Prof. Dr. C. Herrmann
Physikalische Chemie II, Ruhr-Universität Bochum
44780 Bochum (Deutschland)
Fax: (+49) 234-322-5535
E-Mail: hermann.weingaertner@rub.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts. Diana Constantinescu dankt der EU für ein Stipendium im Rahmen des Projekts INTCHEM (MEST-CT-2005-020681).

Tetraalkylammonium ($[C_{i,j,k,l}N]^+$) und Guanidinium ($[guan]^+$). Als komplexe Anionen wurden Thiocyanat ($[SCN]^-$), Methylsulfat ($[MeOSO_3]^-$), Ethylsulfat ($[EtOSO_3]^-$), Trifluormethansulfonat ($[TfO]^-$), Bis(trifluormethansulfonyl)amid ($[Tf_2N]^-$) und Dicyanimid ($[N(CN)_2]^-$) eingesetzt.

Abbildung 1 zeigt einige typische DSC-Thermogramme. In Abwesenheit ionischer Flüssigkeiten setzt die Denaturie-

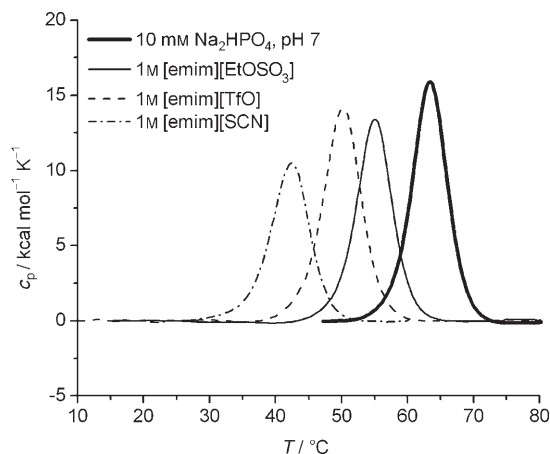
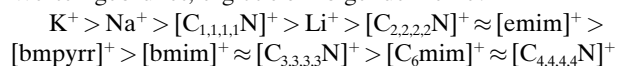


Abbildung 1. Beispiele für grundlinienkorrigierte DSC-Thermogramme wässriger Lösungen von RNase A mit zugesetzten Salzen.

rung der Referenzprobe (5.0 mg mL⁻¹ RNase A, 10 mM Na₂HPO₄-Puffer, pH 7) bei ca. 53°C ein und ist bei 73°C praktisch vollständig. Wiederholte Experimente mit denselben Proben zeigen, dass sich in Lösungen ionischer Flüssigkeiten ein geringer Anteil des Proteins irreversibel entfaltet, der mit zunehmender Salzkonzentration abnimmt. Dennoch ergab eine Anpassung mit einem Zweizustandsmodell eine gute Übereinstimmung der experimentellen und theoretischen Kurven, was die Bestimmung der T_m -Werte ermöglichte. Mit Ausnahme von Lösungen von [bmim][BF₄] zeigten alle DSC-Thermogramme nur den Denaturierungsübergang. Für [bmim][BF₄] wurde ein zweiter Peak bei ca. 100°C beobachtet, der wahrscheinlich einer Hydrolyse des [BF₄]⁻-Ions^[1a] bei hohen Temperaturen zuzuschreiben ist.

Abbildung 2 zeigt Ergebnisse für T_m bei typischen Konzentrationen bis zu $c = 1.5$ M für Salze mit Br⁻ oder Cl⁻ als gemeinsamem Anion. Im Unterschied zu vielen anorganischen Salzen führen im Falle der untersuchten Kationen alle organischen Salze – mit Ausnahme von [C_{1,1,1,1}N]Cl^[9] – zur Destabilisierung von RNase A. Nach abnehmenden T_m -Werten geordnet, ergibt sich folgende Reihe:



Eine zunehmende Hydrophobie des Kations führt offensichtlich zu einer Herabsetzung der Übergangstemperatur T_m . Literaturdaten für die Auswirkungen von drei Imidazoliumchloriden auf die thermische Stabilität von Lysozym^[10] bestätigen diesen Befund. Das Verhalten von [bmpyrr]⁺ und [bmim]⁺ deutet auf einen geringen Unterschied in der Hydrophobie strukturell ähnlicher Pyrrolidinium- und Imidazoliumsalze hin, der wahrscheinlich aus der Lokalisation der

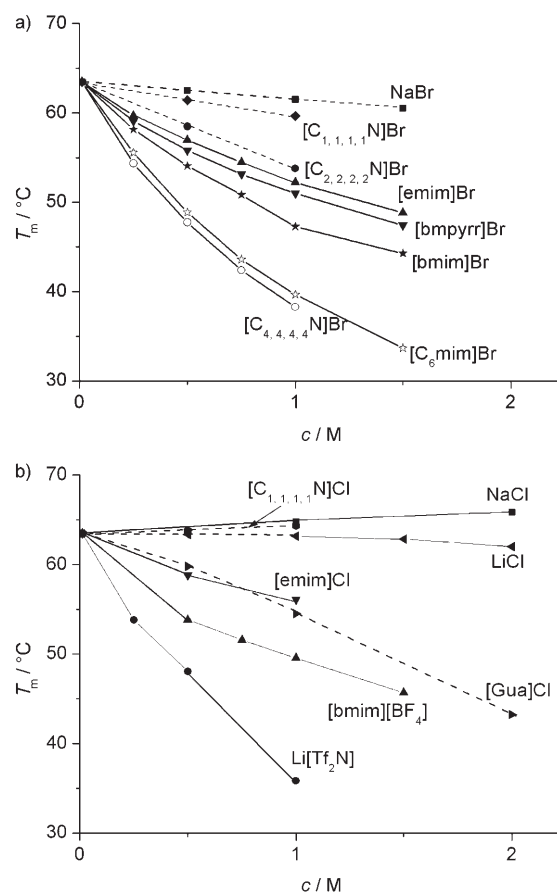
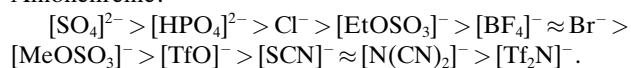


Abbildung 2. Übergangstemperaturen T_m der thermischen Denaturierung von RNase A in Abhängigkeit von der Konzentration c zugesetzter ionischer Flüssigkeiten mit a) Br⁻ und b) Cl⁻ als gemeinsamem Anion. Daten für einige andere Salze sind auch angegeben. Gestrichelte Kurven beziehen sich auf Daten von Lit. [9].

positiven Ladung am Stickstoffatom von [bmpyrr]⁺ resultiert, die im Unterschied zur Delokalisation der Ladung von [bmim]⁺ über den Ring steht.

Abbildung 3 zeigt Ergebnisse für ionische Flüssigkeiten mit [emim]⁺ als gemeinsamem Kation. Da organische Salze mit dem oft eingesetzten [Tf₂N]⁻-Anion mit Wasser nicht mischbar sind, wurden zur Reihung dieses Anions Untersuchungen an Li[Tf₂N] (Abbildung 2b) herangezogen. Nach abnehmenden T_m -Werten geordnet, ergibt sich die folgende Anionenreihe:



Eine schwache Hydratation und eine zunehmende Hydrophobie des Anions destabilisieren offensichtlich den nativen Zustand des Proteins, aber es ist schwierig, die Anionen mithilfe heuristischer Argumente, z.B. der Ionengröße, Oberflächenladungsdichte oder Hydrophobie, zu ordnen, da sie keine homologen Reihen bilden. Sogar bei Anionen, die chemisch miteinander in Beziehung stehen, treten Besonderheiten auf; ein Beispiel ist die Position des [MeOSO₃]⁻-Ions relativ zu [EtOSO₃]⁻. Zhao et al.^[11] berichteten über Salzeffekte auf eine enzymkinetische Reaktion, aus denen die Reihe [EtOSO₃]⁻ > [CF₃SO₃]⁻ > Br⁻ > [BF₄]⁻ resultiert. Dies

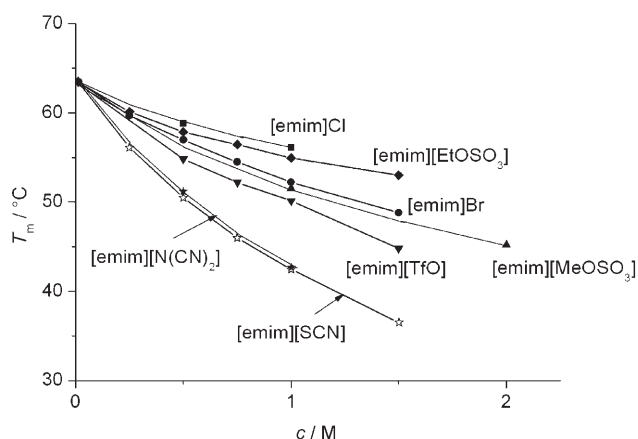


Abbildung 3. Übergangstemperaturen T_m der thermischen Denaturierung von RNase A in Abhängigkeit von der Konzentration c zugesetzter ionischer Flüssigkeiten mit $[emim]^+$ als gemeinsamem Kation.

entspricht dem hier beobachteten generellen Trend, obwohl sich die Positionen benachbarter Ionen leicht unterscheiden.

In einer weit verbreiteten Klassifizierung werden Kationen und Anionen in kosmotrope und chaotrope Ionen eingeteilt. Dabei wird angenommen, dass kosmotrope Ionen die Wasserstruktur verstärken, während chaotrope Ionen die Wasserstruktur zerstören. Auf der Grundlage dieser Einteilung wird üblicherweise angenommen, dass kosmotrope Anionen die native Struktur eines Enzyms stabilisieren, während kosmotrope Kationen diese Struktur destabilisieren, d.h., Anionen und Kationen zeigen entgegengesetzte Korrelationen mit der Stärke der Hydratation.^[6] Verallgemeinert man dieses Bild auf komplexe Anionen, treten zahlreiche Ausnahmen von dieser Regel auf, und das weit verbreitete Bild kosmotroper und chaotroper Effekte erweist sich als zu einfach. Insgesamt zeigt sich, dass eine Variation des Anions größere Auswirkungen auf die Proteinstabilität als eine Variation des Kations haben kann. Über ähnliche Beobachtungen wurde wiederholt bei Untersuchungen zur Enzymaktivität berichtet.^[7]

Zwar bleibt das Verständnis der Hofmeister-Reihe per se eine anspruchsvolle Aufgabe, allerdings scheinen die Salzeffekte genügend allgemein zu sein, um die den biologischen Vorgängen in wässrigen Lösungen zugrunde liegenden Stabilitäts- und Aktivitätsphänomene zu korrelieren - von Enzymaktivitäten und Biokatalyse^[1] bis hin zur Cytotoxizität ionischer Flüssigkeiten.^[12] Dies schließt keineswegs aus, dass einige Proteine z.B. wegen ihrer Nettoladung oder spezifischer Wechselwirkungen mit Ionen^[13] ein abweichendes Verhalten zeigen. Darüber hinaus wurden einige biokatalytische Reaktionen in „reinen“ ionischen Flüssigkeiten (d.h. in Abwesenheit von Wasser oder bei geringem Wassergehalt) durchgeführt. In den letztgenannten Fällen scheinen die Ioneneffekte auf die Enzymstabilität und -aktivität sehr viel

komplexer^[7] und durch die Hofmeister-Reihe nicht beschreibbar zu sein.^[14] Als Beispiel sei erwähnt, dass in wässriger Lösung unter allen untersuchten Anionen $[Tf_2N]^-$ Proteine am stärksten destabilisiert, während in reinen, auf $[Tf_2N]^-$ basierenden Salzen eine Stabilisierung beobachtet wird.^[15]

Experimentelles

Alle ionischen Flüssigkeiten wurden von IoLiTec (Denzlingen) erworben und 24 h unter Vakuum bei 60 °C getrocknet. Ribonuclease A (vom Rind) wurde von Sigma-Aldrich erworben. DSC-Thermogramme wurden mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 60 K h⁻¹ mit einem Kalorimeter VP-DSC der Firma MicroCal (Northampton, USA) aufgenommen. Jedes Thermogramm wurde zwei- bis dreimal wiederholt.

Eingegangen am 24. Mai 2007

Online veröffentlicht am 15. Oktober 2007

Stichwörter: Dynamische Differenzkalorimetrie · Hofmeister-Reihe · Ionische Flüssigkeiten · Proteine · Ribonuclease A

- [1] a) *Ionic Liquids* (Hrsg.: P. Wasserscheid, T. Welton), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**; b) U. Kragl, B. Eckstein, N. Kaftik, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 565; c) F. van Rantwijk, R. M. Lau, R. A. Sheldon, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 131.
- [2] a) S. N. Baker, T. M. McClaskey, S. Pandey, G. A. Baker, *Chem. Commun.* **2004**, 940; b) K. Fujita, M. Forsyth, D. R. McFarlane, R.-W. Reid, G. D. Elliot, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *94*, 1209.
- [3] S. A. Forsyth, J. M. Pringle, D. R. MacFarlane, *Aust. J. Chem.* **2004**, *57*, 113.
- [4] T. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247.
- [5] P. H. von Hippel, K.-Y. Wong, *Science* **1964**, *145*, 577.
- [6] a) K. D. Collins, M. W. Washabaugh, *Q. Rev. Biophys.* **1985**, *18*, 323; b) W. Kunz, P. Lo Nostro, B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9*, 1.
- [7] H. Zhao, *J. Mol. Catal. B* **2005**, *37*, 16.
- [8] a) R. Ravindra, R. Winter, *Z. Phys. Chem.* **2003**, *217*, 1221; b) S. N. Timasheff, *Biochemistry* **2002**, *41*, 13473.
- [9] P. H. von Hippel, K.-Y. Wong, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3909.
- [10] C. Lange, G. Patil, R. Rudolph, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 2693.
- [11] H. Zhao, S. M. Campbell, L. Jackson, Z. Song, O. Olubajo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 377.
- [12] Siehe z.B.: a) J. Ranke, A. Müller, U. Bottin-Weber, F. Stock, S. Stolte, J. Arning, R. Störmann, *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2007**, *67*, 430; b) S. Stolte, J. Arning, U. Bottin-Weber, F. Stock, K. Thiele, M. Uerdingen, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, *Green Chem.* **2006**, *8*, 621.
- [13] M. Boström, F. W. Tavares, S. Finet, F. Skouri-Panet, A. Tardieu, B. W. Ninham, *Biophys. Chem.* **2005**, *117*, 217.
- [14] R. M. Lau, M. J. Sorgetrager, G. Carrea, F. van Rantwijk, F. Secundo, R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2004**, *6*, 483.
- [15] T. de Diego, P. Lozano, M. Gmouh, M. Voltier, I. M. Iborra, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1457.