

# Hofmeister-Effekte unter der Lupe: Die direkte Anion-Amid-Bindung ist schwächer als die Kation-Amid-Bindung

Vasileios Balos, Heejae Kim, Mischa Bonn und Johannes Hunger\*

**Abstract:** Trotz vermehrter Hinweise auf direkte Wechselwirkungen als Ursache für die Destabilisierung von Proteinen durch Ionen blieb die Frage nach der Stärke der Bindung von Anionen zu Proteinen im Vergleich zu jener von Kationen offen. Die Rotation eines Modellamids wurde nun als Maß für die Wechselwirkung verschiedener Anionen mit der Amidgruppe verwendet. Die Untersuchungen zeigen, dass Proteindestabilisierende Salze wie  $KCl$  und  $KNO_3$  die Rotationsmobilität des Amids nicht beeinflussen. Umgekehrt reduzieren denaturierende Salze wie  $KSCN$  und  $KI$  die Rotationsfreiheitsgrade der Amidgruppe merklich. Diese Beobachtungen liefern den Nachweis für eine Proteindenaturierung durch direkte Ion-Protein-Kontakte. Der Vergleich dieser Daten mit denjenigen für die entsprechenden Kation-Amid-Wechselwirkungen zeigt, dass – entgegen der weit verbreiteten Meinung – die Anion-Amid-schwächer als die Kation-Amid-Bindung ist.

Der Einfluss verschiedener Salze auf Biomoleküle, z. B. auf deren Proteindenaturierung, Proteinkristallisation oder enzymatische Aktivität, lässt sich durch die Hofmeister-Reihe vorhersagen.<sup>[1-5]</sup> Diese Reihe besagt, dass Kationen mit hoher Oberflächenladungsdichte und Anionen mit niedriger Oberflächenladungsdichte Proteine tendenziell destabilisieren. Es zeigte sich in den vergangenen Jahren, dass hauptsächlich direkte Kontakte zwischen Ionen und den Biomolekülen dafür verantwortlich sind,<sup>[2,3]</sup> auch wenn indirekte Effekte, die über Wasser vermittelt werden, nicht vollständig vernachlässigt werden können.<sup>[4,6,7]</sup> Die direkten Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und Ionen sind äußerst vielschichtig,<sup>[3,5]</sup> da einerseits Salzlösungen selbst sehr komplex sind<sup>[8]</sup> und Proteine andererseits eine Vielzahl von möglichen spezifischen und nichtspezifischen Bindungsstellen (z. B. das Amidgrundgerüst, die Aminosäure-Seitenketten oder die Termini eines Proteins) aufweisen.<sup>[3,4,9,10]</sup> Wegen dieser Komplexität muss die Korrelation zwischen der Hofmeister-Reihe und der Stärke der Bindung von Ionen zu Proteinen untersucht werden, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen.<sup>[3]</sup>

Direkte Wechselwirkungen zwischen Ionen und dem Amidgrundgerüst, dem grundlegenden Strukturmerkmal aller Proteine, wurden mit verschiedensten spektroskopischen

Methoden untersucht.<sup>[9,11-14]</sup> Direkte Wechselwirkungen werden manchmal infrage gestellt,<sup>[15]</sup> allerdings zeigen NMR-Untersuchungen, dass die chemische Verschiebung der Protonen der Amidgruppe durch Anionen beeinflusst wird<sup>[9,11,12]</sup> und dass der Abstand von Anionen zur Amidgruppe der Hofmeister-Reihe folgt.<sup>[16]</sup> Gleichermaßen werden die  $C=O$ -Schwingung der Amide<sup>[14]</sup> und die chemische Verschiebung des Kohlenstoffatoms der  $C=O$ -Gruppe durch Kationen verändert,<sup>[17]</sup> was mit direkten Kation-Amid-Kontakten vereinbar ist.<sup>[14]</sup> Diese Studien haben zu der Auffassung geführt, dass Kation-Amid-Wechselwirkungen für Hofmeister-Effekte eine geringere Rolle spielen als Anion-Amid-Wechselwirkungen.<sup>[3,14]</sup> Zudem scheinen, trotz ähnlicher Folgerungen aus einigen Computersimulationen,<sup>[12,16,18]</sup> andere Simulationen zu dem entgegengesetzten Ergebnis zu kommen.<sup>[19]</sup> Hierbei ist es wichtig, dass wegen der unterschiedlichen spektroskopischen Empfindlichkeiten und der verschiedenen untersuchten Bindungsstellen (z. B. die  $N-H$ - oder die  $C=O$ -Gruppe des Amids) ein Vergleich der Bindungsstärke von Kationen mit der von Anionen nahezu unmöglich ist. Hier verwenden wir die Rotationsmobilität der Amidgruppe als Maß für die Ion-Amid-Wechselwirkung,<sup>[20]</sup> da die Rotation ähnlich empfindlich auf Kationen und Anionen reagiert.

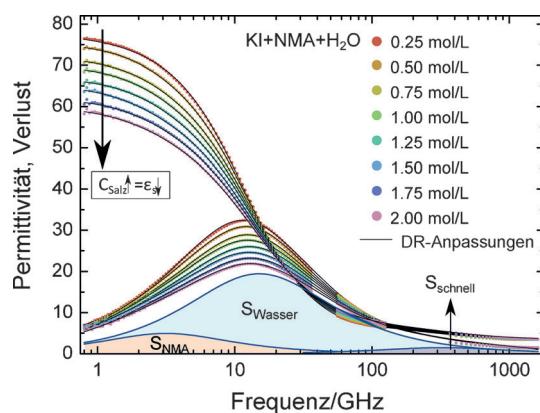
Um die Anion-Amid-Wechselwirkung zu untersuchen, verwenden wir wässrige Lösungen von *N*-Methylacetamid (NMA) unter Zusatz verschiedener anorganischer Salze. Obwohl sich NMA, auch hinsichtlich seiner Rotationsdynamik, stark von einem Protein unterscheidet, ist es ein ideales Modellmolekül mit einer isolierten Amidgruppe. Um ein breites Spektrum von einwertigen Anionen der Hofmeister-Reihe abzudecken, verwenden wir die Kaliumsalze von  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$  und  $SCN^-$ , wobei die Konzentration der Salze,  $c_{\text{Salz}}$ , variiert und die Konzentration von NMA bei  $2 \text{ mol L}^{-1}$  konstant gehalten wird. Die Rotationsdynamik von NMA wurde mithilfe dielektrischer Relaxationsspektroskopie (DRS) untersucht. DRS untersucht die Polarisation einer Probe in einem externen elektrischen Wechselfeld mit Frequenz  $\nu$ .<sup>[21,22]</sup> Für dipolare Flüssigkeiten wird diese Polarisation im Mikrowellenbereich vorwiegend durch die Ausrichtung der permanenten Dipole entlang des angelegten Feldes hervorgerufen. Daher wird bei den vorliegenden Proben die Rotation von dipolaren Wasser- und NMA-Molekülen mit DRS untersucht. Die frequenzabhängige Polarisation wird als komplexe Dielektrizitätszahl,  $\hat{\epsilon}(\nu) = \epsilon'(\nu) - i\epsilon''(\nu)$ , gemessen, wobei der Realteil der Permittivität  $\epsilon'(\nu)$  und der Imaginärteil dem dielektrischen Verlust  $\epsilon''(\nu)$  entspricht. Hier decken wir Frequenzen im Bereich  $0.8 \leq \nu/\text{GHz} \leq 36$  und  $56 \leq \nu/\text{GHz} \leq 125$  mit einem Frequenzdomänen-Reflektometer sowie im Bereich  $0.3 \leq \nu/\text{THz} \leq 1.6$  mit einem THz-

[\*] V. Balos, Dr. H. Kim, Prof. M. Bonn, Dr. J. Hunger  
Abteilung für molekulare Spektroskopie  
Max-Planck-Institut für Polymerforschung  
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)  
E-Mail: hunger@mpip-mainz.mpg.de

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201602769> zu finden.

Zeitdomänen-Spektrometer ab (Details in den Hintergrundinformationen, HI).<sup>[23]</sup>

In Abbildung 1 sind die dielektrischen Spektren wässriger NMA-Lösungen ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) mit steigender Konzentration an KI zu sehen. Alle Spektren zeigen eine Dispersion von  $\epsilon'$  bei ca. 10 GHz und einen entsprechenden Peak von  $\epsilon''$ . Diese Relaxation röhrt von der Orientierungsrelaxation der dipolaren Wasser- und NMA-Moleküle her, wobei beide Relaxationen stark überlappen.<sup>[20,24]</sup> Aus Abbildung 1 ist ersichtlich,



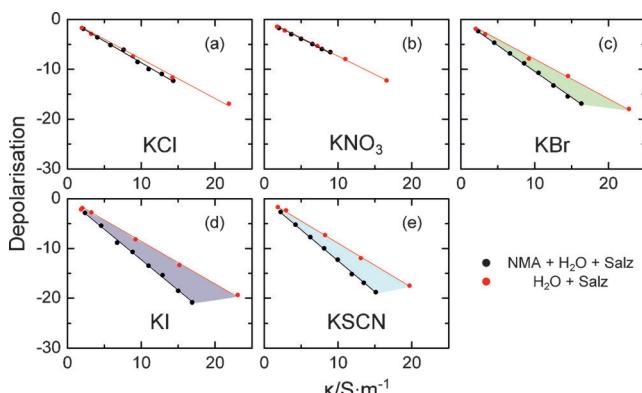
**Abbildung 1.** Komplexe dielektrische Spektren einer wässrigen NMA-Lösung mit steigender Konzentration an KI. Symbole zeigen experimentelle Daten, und durchgezogene Linien zeigen Kurvenanpassungen mithilfe des verwendeten Relaxationsmodells [Gl. (1)]. Die schattierten Kurven zeigen die Beiträge der einzelnen Relaxationsprozesse zur Beschreibung von  $\epsilon''(\nu)$  für  $c_{\text{Salz}} = 2 \text{ mol L}^{-1}$  (rot schattiert: NMA; hellblau schattiert: Volumenwasser; dunkelblau schattiert: schnelle Wasserrelaxation). Zur besseren Veranschaulichung wurde der Beitrag durch Ohmsche Verluste [letzter Term in Gl. (1)] abgezogen.

dass der vorherrschende Effekt der Elektrolytzugabe eine Abnahme der Gesamtrelaxationsamplitude, d.h. eine Abnahme des Integrals des Verlustpeaks, ist. Dieser Rückgang geht mit einer Abnahme der statischen Dielektrizitätskonstante (der Grenzwert von  $\epsilon'$  für  $\nu \rightarrow 0$ ) einher. Im Allgemeinen wird diese Abnahme der Dielektrizitätszahl  $\Delta\epsilon = \epsilon'_{\nu \rightarrow 0}(c_{\text{Salz}} = 0) - \epsilon'_{\nu \rightarrow 0}(c_{\text{Salz}})$  als Depolarisation bezeichnet und wird bei allen untersuchten Proben beobachtet (Abbildungen S1 und S2 der HI).

Der genaue Wert der Dielektrizitätszahl wird generell durch das Ausmaß der Auslenkung der molekularen Dipole aus dem thermischen Gleichgewicht bestimmt. Daher bedeutet eine Depolarisation, dass sich die Dipole in einem geringeren Maß nach dem externen Feld ausrichten können. Im Fall der untersuchten Proben lässt sich ein kleiner Beitrag zur Depolarisation durch Verdünnungseffekte erklären ( $c_{\text{H}_2\text{O}}$  nimmt mit zunehmendem  $c_{\text{Salz}}$ -Wert ab). Bei Elektrolytlösungen wird  $\Delta\epsilon$  maßgeblich von mobilen Ionen beeinflusst und hängt somit von der elektrischen Leitfähigkeit der Proben,  $\kappa$ , ab.<sup>[20,25,26]</sup> Dies ist im Einklang mit der Annahme, dass kinetische Depolarisation (KD)<sup>[20,25–27]</sup> der vorherrschende Depolarisationsmechanismus ist. Ursächlich für KD ist die Kopplung der Translationsbewegung der Ionen mit der Rotationsbewegung der dipolaren Moleküle: Die dipolaren Moleküle folgen eher dem lokal starken elektrischen Feld des

vorbeiwandernden Ions als dem extern angelegten elektrischen Feld. Hierbei ist es wichtig, dass im Falle der hier untersuchten ternären Mischungen der elektrische Dipol von NMA größer ist als der von Wasser. Wegen der Empfindlichkeit von DRS bezüglich des Dipolmoments zum Quadrat ist der Wert von  $\Delta\epsilon$  ungefähr fünfmal höher, wenn ein Ion die Rotation eines NMA-Moleküls hindert, als bei Störung der Rotation eines Wassermoleküls.<sup>[20]</sup> Aufgrund dessen liefert der Wert von  $\Delta\epsilon$  mit steigendem  $\kappa$ -Wert Einblicke in die Verteilung der Ionen in den ternären wässrigen NMA-Salz-Lösungen: Mit zunehmender Nähe der Ionen zu NMA nimmt die Depolarisation  $\Delta\epsilon$  zu. Die Depolarisation der wässrigen Salzlösung entspricht hierbei dem Grenzfall, bei dem die Ionen ausschließlich Wasser beeinflussen. Mit anderen Worten liefert der Vergleich von  $\Delta\epsilon$  für NMA/Salz/ $\text{H}_2\text{O}$ -Lösungen und  $\Delta\epsilon$  für Salz/ $\text{H}_2\text{O}$ -Lösungen ein Maß für die Stärke der Ion-NMA-Wechselwirkung.

Abbildung 2 zeigt die gemessenen Werte für  $\Delta\epsilon$  als Funktion von  $\kappa$  für die untersuchten Salze der Hofmeister-Reihe in wässriger Lösung (rote Symbole) und in 2 m NMA-Lösung (schwarze Symbole). Die Steigungen für die Salz/ $\text{H}_2\text{O}$ -Mischungen in Abbildung 2 sind von der Art des Salzes



**Abbildung 2.** Gesamte Depolarisation,  $\Delta\epsilon$ , wässriger Salzlösungen (rot) und wässriger Salzlösungen mit  $2 \text{ mol L}^{-1}$  NMA (schwarz) für a) KCl, b)  $\text{KNO}_3$ , c) KBr, d) KI und e) KSCN als Funktion der Leitfähigkeit,  $\kappa$ . Die schattierten Flächen heben die Unterschiede zwischen wässrigen Lösungen und wässrigen NMA-Lösungen hervor.

nahezu unabhängig (mit Ausnahme von  $\text{KNO}_3$  und KSCN, bei denen eine schwache Ionenpaarrelaxation bzw. die Anionenrelaxation zum Spektrum beitragen;<sup>[28]</sup> siehe HI). Dies lässt darauf schließen, dass die beobachtete Depolarisation quantitativ mit Verdünnungseffekten und KD erklärt werden kann (Abbildung S3 der HI). Diese Beobachtung stimmt mit früheren Untersuchungen wässriger Lösungen dieser Salze überein.<sup>[29,30]</sup> Anders als bei den binären Salz/ $\text{H}_2\text{O}$ -Mischungen hängt die Steigung der Depolarisation als Funktion von  $\kappa$  im Falle der ternären NMA/Salz/ $\text{H}_2\text{O}$ -Mischungen stark von der Art des zugegebenen Salzes ab: Während für Salze mit geringer Tendenz zur Proteindenaturierung, wie KCl und  $\text{KNO}_3$ , die Daten der wässrigen Salzlösung und der 2 m NMA-Lösung praktisch überlappen (Abbildung 2), weichen die Depolarisationen der 2 m NMA-Lösung für denaturierende Salze, wie KI und KSCN, stark von den Depolarisa-

tionen der wässrigen Lösungen ab. Für das stärkste Denaturierungsmittel dieser Studie, KSCN, ist  $\Delta\epsilon$  für die NMA/KSCN/H<sub>2</sub>O-Lösung gegenüber  $\Delta\epsilon$  der KSCN/H<sub>2</sub>O-Lösung um ca. 30 % erhöht. Wie bereits erwähnt, kann diese erhöhte Depolarisation als verstärkte Wechselwirkung des Salzes mit NMA interpretiert werden. Somit sprechen unsere Beobachtungen für eine vermehrte Nähe von Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> und SCN<sup>-</sup> zu NMA, im Einklang mit einer direkten Wechselwirkung von denaturierenden Anionen mit der Amidgruppe.

Die Depolarisation ist experimentell direkt zugänglich und unabhängig von Modellannahmen und ermöglicht es somit, die Amid-Ion-Wechselwirkung qualitativ zu betrachten. Um unsere Beobachtungen quantitativ auszuwerten, zerlegen wir die Spektren mit einem Relaxationsmodell in die einzelnen Beiträge von Wasser und NMA. Für reines Wasser werden im hier untersuchten Frequenzbereich zwei Relaxationsmoden beobachtet: die kollektive Rotationsrelaxation von Wasserstoffbrücken-gebundenem Wasser bei ca. 20 GHz und ein kleiner Beitrag bei ca. 200 GHz.<sup>[22]</sup> Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von NMA zu einem zusätzlichen Relaxationsprozess bei etwa 4 GHz führt.<sup>[20,31]</sup> Unter Annahme von nichtkorrelierter Rotation der Dipole verwenden wir zur Beschreibung der experimentellen Spektren ein Modell aus drei Relaxationsprozessen [Gl. (1)].

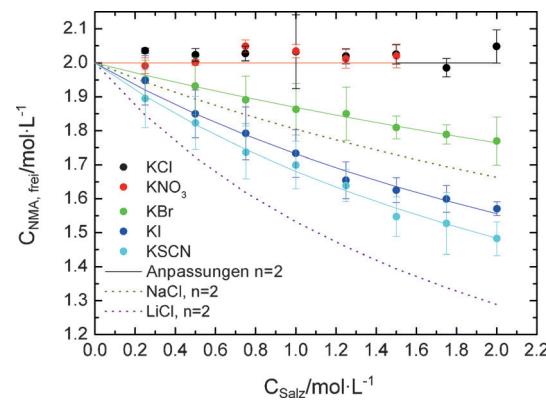
$$\hat{\epsilon}(\nu) = \frac{S_{\text{NMA}}}{1 + (2\pi i\nu\tau_{\text{NMA}})} + \frac{S_{\text{Wasser, erw}}}{1 + (2\pi i\nu\tau_{\text{Wasser}})^{(1-\alpha)}} + \frac{S_{\text{schnell}}}{1 + (2\pi i\nu\tau_{\text{schnell}})} + \epsilon_{\infty} + \frac{\kappa}{2\pi\nu\epsilon_0} \quad (1)$$

Dabei entsprechen  $S_j$  und  $\tau_j$  den Relaxationsamplituden bzw. Relaxationszeiten,  $\epsilon_{\infty}$  stellt die Grenzpermittivität bei unendlicher Frequenz dar, und  $\epsilon_0$  ist die elektrische Feldkonstante. Der letzte Term in Gleichung (1) berücksichtigt Ohmsche Verluste, hervorgerufen durch die elektrische Leitfähigkeit,  $\kappa$ . Analog zu den Beobachtungen für viele wässrige Elektrolytlösungen verwenden wir zur Beschreibung der dominierenden Wasserrelaxation eine symmetrisch verbreiterte Cole-Cole-Mode, wobei  $\alpha$  ein Maß für die Verbreiterung ist.<sup>[20,32]</sup>

Um die stark überlappenden Beiträge von Wasser und NMA zu trennen, verringern wir die Anzahl der freien Parameter: Da Wassermoleküle die vorherrschenden Moleküle in Lösung sind ( $c_{\text{H}_2\text{O}}$  ist mindestens 20-mal höher als die Konzentration von NMA), verwenden wir für die Amplitude der Wasserrelaxation den Wert, der für eine ideale Mischung erwartet wird (zufällige Verteilung der Ionen in Lösung; Details in den HI und Lit. [20,28]).

Wie aus Abbildung 1 (siehe auch Abbildung S1 der HI) ersichtlich ist, beschreibt dieses abhängige Modell die experimentellen Spektren sehr gut. Aus diesen Kurvenanpassungen geht hervor, dass die schnelle Wasserrelaxation durch die Zugabe der Salze kaum beeinflusst wird (siehe Abbildungen S5 und S6 der HI), außer einer leichten Zunahme von  $S_{\text{schnell}}$  mit zunehmendem  $c_{\text{Salz}}$ -Wert. Diese Relaxationsmode kann als schnelle, geringfügige Auslenkung eines Wassermoleküls, vor einer sprungartigen Rotation um einen großen Winkel, interpretiert werden.<sup>[33]</sup> Demzufolge ist der Anstieg der Amplitude im Einklang mit einer vermehrten Rotati-

onsfreiheit der Wassermoleküle in der Hydrathülle von Anionen.<sup>[34]</sup> Analog zu den Beobachtungen in wässrigen Elektrolytlösungen verbreitert sich die Wasserrelaxation (Abbildung S7 der HI), und  $\tau_{\text{Wasser}}$  nimmt mit steigender Salzkonzentration ab (Abbildung S6 der HI), was auf schwächere und breiter verteilte Wasserstoffbrücken hindeutet.<sup>[30,35]</sup> Analog kann dies als Abnahme der Kollektivität der Wasserrotation betrachtet werden.<sup>[27]</sup> Umgekehrt nimmt  $\tau_{\text{NMA}}$  mit steigendem  $c_{\text{Salz}}$ -Wert zu. Dies kann mit einer Zunahme der Viskosität der Proben in Verbindung gebracht werden und somit durch eine hydrodynamische Rotationsbewegung von NMA erklärt werden.<sup>[20,31]</sup> Viel wichtiger ist jedoch, dass aus den erhaltenen Werten für  $S_{\text{NMA}}$  direkt die scheinbare Konzentration der NMA-Moleküle, die nicht vom Salz beeinflusst werden,  $c_{\text{NMA, frei}}$ , berechnet werden kann (siehe HI). Wie aus der Auftragung der Werte in Abbildung 3 ersichtlich ist, beeinflusst die Zugabe von KCl und KNO<sub>3</sub> die Rotationsfreiheitsgrade von NMA kaum. Im Unterschied dazu führt die Zugabe von KSCN, KI und KBr zu einer merklichen Abnahme von  $c_{\text{NMA, frei}}$ , was mit den qualitativen Beobachtungen aus Abbildung 2 übereinstimmt (siehe oben). Diese Abnahme von  $c_{\text{NMA, frei}}$  kann durch eine verringerte Beweglichkeit einzelner NMA-Moleküle oder durch eine verminderte Wechselwirkung zwischen NMA-Molekülen verursacht werden.<sup>[27]</sup>



**Abbildung 3.** Konzentration freier NMA-Moleküle als Funktion der Salzkonzentration. Die Linien zeigen Kurvenanpassungen mittels Gleichung (3) mit  $n = 2$ . Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung bei mindestens sechs unabhängigen Messungen. Zum Vergleich sind Ergebnisse für verschiedene Kationen (NaCl und LiCl) mit  $n = 2$  dargestellt.<sup>[20]</sup>

In Anlehnung an unsere Studie zu den Kationen<sup>[20]</sup> beschreiben wir diese Wechselwirkungen mithilfe eines Assoziationsgleichgewichtes, bei dem  $n$  NMA-Moleküle mit einem Anion A<sup>-</sup> wechselwirken [Gl. (2)]. Die entsprechende Gleichgewichtskonstante,  $K$ , ist gemäß Gleichung (3) definiert.



$$K = \frac{c_{n\text{NMA}\cdot\text{A}^-}}{(c_{\text{NMA, frei}})^n c_{\text{A}^-}} \quad (3)$$

Wie in Abbildung 3 dargestellt ist, beschreiben derartige Assoziationsgleichgewichte die beobachtete Abnahme von  $c_{\text{NMA,frei}}$  mit zunehmendem  $c_{\text{Salz}}$ -Wert, sofern die Bindung von bis zu zwei NMA-Molekülen zugrunde gelegt wird [ $n = 2$  in Gl. (3)], während die Annahme von  $n = 1$  die Daten schlechter beschreibt (Abbildung S8 der HI).<sup>[36]</sup> Die so erhaltenen Assoziationskonstanten mit  $n = 2$  entsprechen dem Trend, den man aufgrund der Hofmeister-Reihe erwartet:  $K_{\text{KBr}}^{\text{DRS}} = 0.02 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2}$ ,  $K_{\text{KI}}^{\text{DRS}} = 0.05 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2}$  und  $K_{\text{KSCN}}^{\text{DRS}} = 0.07 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2}$ . Für Anionen mit hoher Fähigkeit zur Denaturierung von Proteinen, wie  $\text{SCN}^-$  und  $\text{I}^-$ , sind die erhaltenen Werte von  $K$  für  $n = 1$  (in Anlehnung an Lit. [11]) in Gleichung (3) ( $K_{\text{KSCN}}^{\text{DRS}} = 0.25 \text{ L mol}^{-1}$  und  $K_{\text{KI}}^{\text{DRS}} = 0.20 \text{ L mol}^{-1}$ ) kleiner als die Werte, die durch Untersuchung der Löslichkeit von amidhaltigen Polymeren  $K_{\text{SCN}^-}^{\text{lös}} = 4 \text{ L mol}^{-1}$  und  $K_{\text{I}^-}^{\text{lös}} = 1.5 \text{ L mol}^{-1}$ <sup>[11]</sup> oder durch die Untersuchungen der chemischen Verschiebung der Protonen der Amidgruppe ( $K_{\text{SCN}^-}^{\text{NMR}} = 14 \text{ L mol}^{-1}$  und  $K_{\text{I}^-}^{\text{NMR}} = 3.8 \text{ L mol}^{-1}$ )<sup>[11]</sup> erhalten wurden. Die große Bandbreite der bestimmten Wechselwirkungsstärken ist wiederum ein Kennzeichen für die Abhängigkeit der Assoziationskonstanten von der verwendeten Messmethode.

Die ähnliche Empfindlichkeit der NMA-Rotation für Wechselwirkungen mit Anionen und Kationen ermöglicht es, die jetzigen Ergebnisse mit unserer früheren Studie zur Wechselwirkung von Hofmeister-Kationen mit NMA zu vergleichen.<sup>[20]</sup> Ein solcher Vergleich zeigt, dass die Anion-Amid-Bindung schwächer als die Kation-Amid-Bindung ist: Wie die Darstellung der Werte von  $c_{\text{NMA,frei}}$  in Abbildung 3 unter Zugabe von  $\text{NaCl}$  und  $\text{LiCl}$  zeigt (gestrichelte Linien), beeinflussen stark denaturierende einwertige Kationen, wie  $\text{Li}^+$ , die Rotation von NMA stärker als  $\text{SCN}^-$ . Vergleicht man unsere Ergebnisse für einwertige Kationen mit denen einwertiger Anionen, zeigt sich, dass Kationen am Rand der Hofmeister-Reihe die Rotation von ca. zweimal mehr NMA-Molekülen einschränken können als Anionen (vgl.  $K_{\text{KSCN}}^{\text{DRS}} = 0.07 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2}$  mit  $K_{\text{LiCl}}^{\text{DRS}} = 0.13 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2}$ <sup>[20]</sup> mit  $n = 2$ ).

Die stärkere Wechselwirkung von Kationen mit der  $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe von NMA gegenüber der Wechselwirkung der Anionen mit der N-H-Gruppe stimmt auch mit Ergebnissen von Moleküldynamiksimulationen überein.<sup>[9,19]</sup> Da die intermolekularen Amid-Amid-Wasserstoffbrücken ( $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ ) ein Schlüsselement zur Stabilisierung der Sekundärstruktur von Proteinen sind, würde man aufgrund der Ion-Amid-Bindungsstärke erwarten, dass Kationen Proteine stärker destabilisieren als Anionen. Dennoch können Anionen im Allgemeinen die Struktur von Proteinen effizienter aufbrechen.<sup>[2]</sup> Dieser scheinbare Widerspruch zeigt, dass die Wechselwirkungen von Ionen mit den Amideinheiten und die damit verbundene Schwächung der Amid-Amid-Bindungen nicht die einzige Ursache für die Destabilisierung von Proteinen sind. Im Speziellen sind bei Anionen die Aminosäure-Seitenketten, welche die Proteinstruktur maßgeblich beeinflussen, wichtige Bindungsstellen. Die Destabilisierung von hydrophoben Wechselwirkungen<sup>[37]</sup> könnte den überproportional großen Einfluss von Anionen auf die Proteinstruktur erklären. Unsere Beobachtung, dass auch die Anion-Amid-Wechselwirkungen der Hofmeister-Reihe folgen, lässt darauf

schließen, dass auch Ion-Amid-Bindungen zur Proteindestabilisierung beitragen, speziell zur Stabilisierung des entfalteten Proteins (Zufallsknäuel) in Lösung, wo die Amidgruppen der Elektrolytlösung stark ausgesetzt sind.

## Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für Förderung im Rahmen des Projekts HU1860/4. H.K. dankt sich für Förderung durch das Horizon-2020-Programm der Europäischen Union (Nr. 658467).

**Stichwörter:** Amide · Anionen · Denaturierung · Dielektrische Spektroskopie · Spezifische Ioneneffekte  
**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8125–8128  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 8257–8261

- [1] F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1888**, *24*, 247–260.
- [2] Y. Zhang, P. S. Cremer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2010**, *61*, 63–83.
- [3] P. Jungwirth, P. S. Cremer, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 261–263.
- [4] W. J. Xie, Y. Q. Gao, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 4247–4252.
- [5] A. Salis, B. W. Ninham, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7358–7377.
- [6] J. Holzmann, R. Ludwig, A. Geiger, D. Paschek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8907–8911; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9065–9069.
- [7] D. Paschek, R. Ludwig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 352–353; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 368–370.
- [8] Y. Marcus, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1346–1370.
- [9] a) J. Hladíková, J. Heyda, K. B. Rembert, H. I. Okur, Y. Kurra, W. R. Liu, C. Hilty, P. S. Cremer, P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 4069–4073; b) J. Paterová, K. B. Rembert, J. Heyda, Y. Kurra, H. I. Okur, W. R. Liu, C. Hilty, P. S. Cremer, P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 8150–8158.
- [10] H. Meuzelaar, M. R. Panman, S. Woutersen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15255–15259; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 15470–15474.
- [11] K. B. Rembert, H. I. Okur, C. Hilty, P. S. Cremer, *Langmuir* **2015**, *31*, 3459–3464.
- [12] K. B. Rembert, J. Paterová, J. Heyda, C. Hilty, P. Jungwirth, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10039–10046.
- [13] H. Kim, H. Lee, G. Lee, H. Kim, M. Cho, *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 124501.
- [14] H. I. Okur, J. Kherb, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5062–5067.
- [15] R. L. Baldwin, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2056–2063.
- [16] E. A. Algaer, N. F. A. van der Vegt, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13781–13787.
- [17] C. P. Rao, P. Balaraj, C. N. R. Rao, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1980**, *76*, 1008–1013.
- [18] N. Schwierz, D. Horinek, R. R. Netz, *Langmuir* **2013**, *29*, 2602–2614.
- [19] a) H. Du, R. Wickramasinghe, X. Qian, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 16594–16604; b) J. Heyda, J. C. Vincent, D. J. Tobias, J. Dzubiella, P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1213–1220.
- [20] a) V. Balos, M. Bonn, J. Hunger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 28539–28543; b) V. Balos, M. Bonn, J. Hunger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 1346–1347.
- [21] a) F. Kremer, A. Schönhals, *Broadband Dielectric Spectroscopy*, Springer, Berlin, **2003**; b) U. Kaatze, Y. Feldman, *Meas. Sci. Technol.* **2006**, *17*, R17–R35.
- [22] T. Fukasawa, T. Sato, J. Watanabe, Y. Hama, W. Kunz, R. Buchner, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 197802.

- [23] W. Ensing, J. Hunger, N. Ottosson, H. J. Bakker, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 12930–12935.
- [24] R. Pottel, D. Adolph, U. Kaatze, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 278–285.
- [25] M. Sega, S. Kantorovich, A. Arnold, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 130–133.
- [26] N. Ottosson, J. Hunger, H. J. Bakker, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12808–12811.
- [27] K. F. Rinne, S. Gekle, R. R. Netz, *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 11667–11677.
- [28] Man beachte, dass für  $\text{KNO}_3$ -Lösungen der Betrag von  $\Delta\epsilon$  etwas geringer ist, als man auf Basis von Verdünnungseffekten und kinetischer Depolarisation erwarten würde. Dies kann durch die schwache Bildung von Ionenpaaren erklärt werden (siehe Abbildungen S3 und S4 der HI). In ähnlicher Weise trägt bei  $\text{KSCN}$ -Lösungen die Rotation des nichtzentrosymmetrischen  $\text{SCN}^-$ -Anions zu den Spektren bei. In unserer quantitativen Auswertung korrigieren wir diese Beiträge (siehe HI).
- [29] T. Chen, G. Heftner, R. Buchner, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 4025–4031.
- [30] W. Wachter, W. Kunz, R. Buchner, G. Heftner, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 8675–8683.
- [31] U. Kaatze, H. Gerke, R. Pottel, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 5464–5469.
- [32] U. Kaatze, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3111–3113.
- [33] A. Y. Zasetsky, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*, 117601.
- [34] S. T. van der Post, K. Tielrooij, J. Hunger, E. H. G. Backus, H. J. Bakker, *Faraday Discuss.* **2013**, *160*, 171.
- [35] H. J. Bakker, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1456–1473.
- [36] Belässt man  $n$  als freien Parameter, streuen die Werte der Kurvenanpassung um  $n = 2$ :  $n_{\text{KBr}} = (2.6 \pm 0.7)$ ,  $n_{\text{KI}} = (2.0 \pm 0.5)$  und  $n_{\text{KSCN}} = (1.8 \pm 0.4)$ .
- [37] P. Jungwirth, B. Winter, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 343–366.

Eingegangen am 19. März 2016

Online veröffentlicht am 30. Mai 2016