



This is the peer reviewed version of the following article:

Balos, V., Marekha, B. A., Malm, C., Wagner, M., Nagata, Y., Bonn, M., et al. (2019). Spezifische Ionen-Effekte am Beispiel eines Oligopeptids: die Rolle zweizähliger Koordination beim Guanidinium-Kation. *Angewandte Chemie*, 131(1), 338-343. doi:10.1002/ange.201811029.

, which has been published in final form at: [10.1002/ange.201811029](https://doi.org/10.1002/ange.201811029)

Spezifische Ionen-Effekte am Beispiel eines Oligopeptids: Die Rolle zweizähliger Koordination beim Guanidinium Kation

Vasileios Balos, Bogdan Marekha, Christian Malm, Manfred Wagner,
Yuki Nagata, Mischa Bonn and Johannes Hunger*

Spezifische Ionen-Effekte am Beispiel eines Oligopeptids: Die Rolle zweizähliger Koordination beim Guanidinium Kation

Vasileios Balos,^[a,b] Bogdan Marekha,^[a] Christian Malm,^[a] Manfred Wagner,^[a] Yuki Nagata,^[a] Mischa Bonn^[a] und Johannes Hunger^{*[a]}

Abstract: Trotz der Relevanz von Ion-Protein Wechselwirkungen für die Funktion von Proteinen, macht es die Vielzahl der möglichen Bindungsstellen an Proteinen schwer diese Bindungen im Detail zu verstehen. Um spezifische Ionen-Effekte auf verschiedene Proteinbindungsstellen zu erfassen, untersuchen wir den Einfluss verschiedener Salze auf des zwitterionische Peptid Triglycin. Dielektrische Spektren zeigen, dass Salze die Rotationsdynamik des Peptids beeinflussen, wobei der Effekt von stark denaturierenden Kationen (Li^+ , Guanidinium Gdm^+) und Anionen (I^- , SCN^-) ausgeprägter ist als der Effekt schwach denaturierender Ionen (K^+ , Cl^-). Bemerkenswerterweise sind die Effekte von Gdm^+ und Li^+ ähnlich. Molekulardynamik Simulationen bestätigen, dass sich Gdm^+ und Li^+ verstärkt an Triglycin anlagern, jedoch mit einer unterschiedlicher Bindungsgeometrie: Während Li^+ hauptsächlich an der Carboxylatgruppe bindet, ist eine zweizählige Bindung zu einem Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe und zum Sauerstoffatom der benachbarten Amidgruppe von besonderer Bedeutung. Eine derartige zweizählige Bindung beeinflusst die Konformation des Peptids verstärkt. Daher könnte diese Bindungsgeometrie die hohe Denaturierungsaktivität von Gdm^+ Salzen erklären.

Spezifische Ionen-Effekte, d.h. der Einfluss von Salzen auf makroskopische Eigenschaften wie zum Beispiel auf die Oberflächenspannung,^[1] Löslichkeiten,^[2,3] Grenzflächenpotenziale,^[4] Kolloidstabilität,^[5] oder auch biologische Aktivität^[5,6] sind allgegenwärtig. Trotzdem ist ein molekulares Verständnis dieser Ionen-Effekte, das über rein elektrostatische Auswirkungen hinausgeht, noch nicht vollständig erreicht.^[7] Im Speziellen ist es schwierig den Einfluss von Ionen auf Proteine zu verstehen.^[6,8,9] Hierfür ist die strukturelle Komplexität und die damit einhergehende Vielzahl an Bindungsstellen mitverantwortlich.^[10]

Um Wechselwirkungen zwischen Ionen und Proteinen zu verstehen, werden oft Amidgruppen-haltige Modellsysteme betrachtet.^[3,11–18] Diese Modellsysteme enthalten aber keine geladenen Termini (C- und N-Terminus), welche elektrostatisch stark mit Ionen wechselwirken können. Bei kleinen Oligopeptiden – welche sowohl die geladenen Termini als auch ein Amidgerüst besitzen – konnte gezeigt werden, dass die Termini die Bindung

mit Anionen dominieren.^[12] Die Termini scheinen die Trends der Ionen- Amidrückgrat Wechselwirkungen sogar umzukehren.^[19] Folglich haben diese Untersuchung,^[12,19] hauptsächlich mittels Kern-Resonanzspektroskopie und Computersimulationen, zeigen können, dass die Termini die Anion-Protein Wechselwirkung nachhaltig beeinflussen. Andererseits wurde auch gezeigt, dass Kation-Amid Wechselwirkungen wichtig sind.^[11,14–16] Der Effekt verschiedener Kationen auf Oligopeptide und im Umkehrschluss auf die Termini, blieb aber weitgehend unerforscht.^[20–22]

In dieser Studie untersuchen wir den Einfluss von Kationen und Anionen auf das Oligopeptid Triglycin (GGG), welches zwei Amidgruppen und beide Termini umfasst ($-\text{COO}^-$ und $-\text{NH}_3^+$). Um den Einfluss der Termini zu ergründen, untersuchen wir die Rotation des zwitterionischen Triglycin unter Zugabe verschiedener Salze in wässriger Lösung. Als Salze verwenden wir KCl , LiCl , Guanidinium Chlorid (GdmCl), KI und KSCN .^[23] Mithilfe unserer vorherigen Untersuchungen zum Einfluss dieser Salze auf die Rotation des Amid-Modellsystem *N*-Methylacetamid,^[14,15,17,18] kann durch diese Ergebnisse der Beitrag der geladenen Termini zur Wechselwirkung mit Ionen abgeschätzt werden.

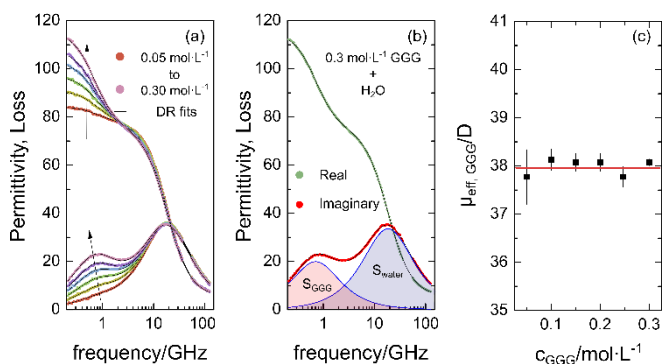


Abbildung 1. (a) Komplexe dielektrische Spektren wässriger Triglycin Lösungen im Konzentrationsbereich c_{GGG} 0.05 - 0.30 mol·L⁻¹ in 0.05 mol·L⁻¹ Inkrementen. Pfeile deuten steigende GGG Konzentration an. (b) Dielektrisches Spektrum einer wässrigen GGG Lösung mit $c_{\text{GGG}} = 0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Symbole zeigen experimentelle Daten, Linien zeigen Kurvenanpassungen mit Gl. 1. Der Ohm'sche Verlust (letzter Term in Gl. 1) wurde zur besseren Darstellung subtrahiert. Die schattierten Kurven zeigen den Beitrag der einzelnen Relaxationsprozesse zum dielektrischen Verlust (Wasser: blau-schattiert; GGG: rot-schattiert). (c) Effektives Dipolmoment von Triglycin (berechnet durch Gl. S1) als Funktion von c_{GGG} . Die rote Linie zeigt den Mittelwert von 38 D.

Um die Rotation von GGG zu untersuchen, verwenden wir dielektrische Relaxationsspektroskopie (DRS).^[23,24] Diese Methode zeichnet die frequenzabhängige, komplexe Dielektrizitätszahl, $\hat{\epsilon}(\nu) = \epsilon'(\nu) - i\epsilon''(\nu)$ auf, welche ein Maß für

[a] Dr. V. Balos, Dr. B. Marekha, Mr. C. Malm, Dr. M. Wagner, Dr. Y. Nagata, Prof. M. Bonn, Dr. J. Hunger
Abteilung für molekulare Spektroskopie,
Max Planck Institute für Polymerforschung,
Ackermannweg 10, 55128 Mainz, Deutschland
E-mail: hunger@mpip-mainz.mpg.de

[b] Momentane Adresse:
Dr. V. Balos
Abteilung für physikalische Chemie,
Fritz Haber Institut der Max Planck Gesellschaft,
Faradayweg 4, 14195 Berlin, Deutschland

die Polarisation der Probe in einem externen, elektrischen Feld ist. Bei dipolaren Flüssigkeiten wird diese Polarisation im Mikrowellenbereich durch molekulare Rotation verursacht. Bei unkorrelierter Rotation der Moleküle führt die diffusive Rotation der Moleküle zu einem Maximum im dielektrischen Verlustspektrum (Imaginärteil der komplexen Dielektrizitätszahl, $\epsilon''(\nu)$) und einer Dispersion der Dielektrizitätszahl (Realteil, $\epsilon'(\nu)$), wobei die Gipffrequenz der charakteristischen Rotationszeit entspricht.

Zuerst bestimmen wir die dielektrischen Eigenschaften von wässrigen GGG Lösungen. In Abb. 1a sind die DRS Spektren wässriger GGG Lösungen bei Konzentrationen im Bereich $c_{GGG} = 0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ bis $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dargestellt. Alle Spektren in Abb. 1a zeigen einen Relaxationsprozess (Scheitelpunkt von $\epsilon''(\nu)$) und Dispersion von $\epsilon'(\nu)$) bei $\sim 20 \text{ GHz}$, welcher der Relaxation von Wasserstoffbrücken-gebundenem Wasser zugeschrieben werden kann.^[25] Sowohl die Gipffrequenz als auch die Relaxationsstärke (Amplitude) dieses Prozesses ändern sich durch Zugabe von GGG kaum. Mit zunehmender GGG Konzentration entsteht ein Relaxationsprozess bei $\sim 1 \text{ GHz}$, was darauf hindeutet, dass diese niederfrequente Relaxation von GGG verursacht wird. Dieser niederfrequente Beitrag ähnelt dem, der in wässrigen Aminosäurelösungen gefunden wurde.^[26,27] Die Amplitude der entstehenden GGG Relaxation ist eher hoch, da das zwitterionische GGG ein hohes elektrisches Dipolmoment besitzt. Das Gipfelmilieu der Relaxation bei $\sim 1 \text{ GHz}$ verschiebt sich mit steigender Konzentration zu niedrigeren Frequenzen, was auf eine Verlangsamung der Rotation der GGG Moleküle schließen lässt.

Um quantitative Informationen zu erhalten, modellieren wir die Spektren mit einem Relaxationsmodell bestehend aus zwei separaten Relaxationsprozessen: die Wasserrelaxation wird mit einer Cole-Cole Funktion^[28] und die GGG Relaxation mit einer Debye Funktion beschrieben.^[28]

$$\epsilon(\nu) = \frac{S_{GGG}}{1+(2\pi i\nu\tau_{GGG})} + \frac{S_{water}}{1+(2\pi i\nu\tau_{water})^{(1-\alpha_{CC})}} + \epsilon_{\infty} + \frac{\kappa}{2\pi i\nu\epsilon_0} \quad (1)$$

wobei S_j die Relaxationsamplituden und τ_j die Relaxationszeiten sind. Der Cole-Cole Parameter α_{CC} definiert die symmetrische Verbreiterung der Wasserrelaxation (relativ zu einer Debye Relaxation). ϵ_{∞} ist der Grenzwert der Dielektrizitätszahl bei höheren Frequenzen (höher als die hier untersuchten Frequenzen). Der letzte Term in Gl. 1 modelliert den Ohm'schen Verlust, der durch die Leitfähigkeit, welche wir real und frequenzunabhängig annehmen (heißt die Gleichstromleitfähigkeit, κ), hervorgerufen wird. ϵ_0 ist die Permeabilität des Vakuums.

Dieses Modell beschreibt die experimentellen Spektren sehr gut (Abb. 1a). Die Parameter aus der Kurvenanpassung zeigen, dass die Relaxationsamplitude der Wasserrelaxation mit zunehmender c_{GGG} abnimmt. Diese Abnahme kann quantitative durch die Abnahme der Volumenkonzentration des Wassers bei Zugabe von GGG erklärt werden (siehe Hintergrundinformationen, HI, Abb. S1). Die Relaxationszeit τ_{water} nimmt kontinuierlich von 8.3 ps bei $c_{GGG} = 0.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (reines Wasser) zu einem Wert von 8.7 ps bei $c_{GGG} = 0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu (Abb. S2, HI). Bei Aminosäuren wurde diese Verlangsamung der mittleren Wasserrelaxation der Ausbildung einer Hydrathülle mit langsamerer Rotationsdynamik zugeschrieben.^[26] Genauso nimmt die Relaxationszeit der GGG

Relaxation, τ_{GGG} , von 200 ps bei niedrigen Konzentrationen zu 225 ps bei $c_{GGG} = 0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu. Dieser Anstieg spiegelt die Zunahme der Viskosität wider (siehe Abb. S2a, HI), was auf eine diffusive Rotation von GGG hindeutet – ähnlich den Beobachtungen bei Lösungen von Aminosäuren.^[26] Die Relaxationsamplitude, S_{GGG} , steigt linear mit c_{GGG} an (Abb. S1, HI): Da die Amplitude mit der Konzentration der Dipole und dem Quadrat des effektiven Dipolmoments skaliert, zeigt dieser lineare Anstieg, dass das effektive Dipolmoment unabhängig von der GGG Konzentration ist. Mithilfe der Cavell Beziehung,^[29] welche S_{GGG} durch c_{GGG} und das effektive Dipolmoment, $\mu_{\text{eff, GGG}}$, ($S_{GGG} \sim c_{GGG} \cdot \mu_{\text{eff, GGG}}^2$) ausdrückt, finden wir einen konstanten Wert für $\mu_{\text{eff, GGG}} \approx 38 \text{ D}$ innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs (Abb. 1c). Dieser konstante Wert deutet darauf hin, dass – trotz des hohen Dipolmoments von GGG – die Relaxation durch unkorrelierte Rotation von GGG Zwitterionen hervorgerufen wird.^[30]

Eine ähnliche Beobachtung wurde für Lösungen der Aminosäure Glycin gemacht, für welches keine Dipol-Dipol-Korrelationen bis zu einer Konzentration von $2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nachgewiesen werden konnten.^[26] Daher deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die beobachtete Relaxation durch die Rotation von isolierten GGG Zwitterionen verursacht wird und der Wert von $\mu_{\text{eff, GGG}}$ kann somit mit dem elektrischen Dipolmoment von GGG in Verbindung gebracht werden. Da im Fall von GGG der Wert von $\mu_{\text{eff, GGG}}$ hauptsächlich den mittleren Abstand der geladenen Termini widerspiegelt, liefern unsere Experimente Informationen zur Konformation des GGG Zwitterions in Lösung.^[20] Die Konformation von Triglycin wurde als eher flexibel beschrieben, da das Fehlen von Proteinseitenketten die Barrieren für Konformationsänderungen eher gering hält, im Speziellen im Vergleich zu Oligopeptiden auf Basis anderer Aminosäuren.^[31–33]

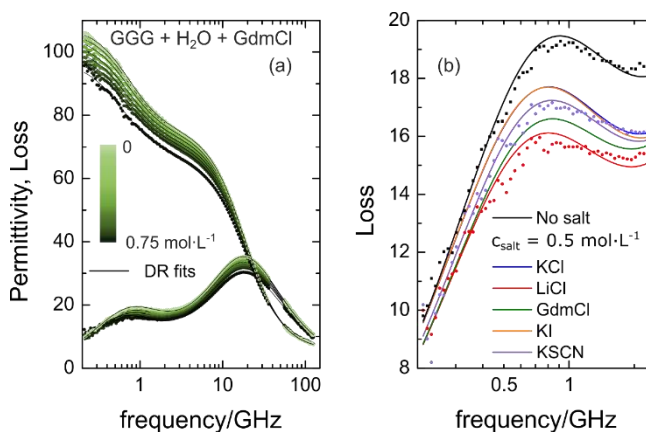


Abbildung 2. (a) Komplexe dielektrische Spektren einer $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ wässrigen Lösung von Triglycin mit zunehmender Konzentration von GdmCl ($0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.75 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Die Symbole zeigen die experimentellen Daten und die Linien zeigen die Kurvenanpassung mit Gl. 1. Zur besseren Darstellung wurde der Ohm'sche Verlust (letzter Term in Gl. 1) subtrahiert. (b) Vergrößerte Darstellung des dielektrischen Verlustes einer $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Triglycin Lösung unter Zugabe verschiedener Salze (jeweils $0.50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) bei niedrigen Frequenzen. Symbole zeigen experimentelle Daten für KSCN, LiCl, und ohne Salzzugabe (die anderen Daten wurden zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt) und die Linien zeigen Kurvenanpassungen mit Gl. 1.

Da Konformationsänderungen in direktem Zusammenhang mit spezifischen Ioneneffekten auf Proteine stehen, untersuchen wir den Beitrag von verschiedenen GGG Konformationen zu $\mu_{\text{eff, GGG}}$

mittels einer 100 ns langen Molekuldynamik (MD) Simulation einer verdünnten GGG Lösung (Details zu der Simulation und dem Beitrag induzierter Dipolmomente sind in den HI zu finden). Diese Simulation liefert eine breite Verteilung von Dipolmomenten mit einem Maximum bei ca. 44 D und einem Mittelwert von 40.6 ± 0.3 D (für detaillierte Informationen, siehe unten). Dieser Wert stimmt gut mit dem experimentell erhaltenen Wert des effektiven Dipolmoments von 38.0 ± 0.2 D überein. Die Simulationsergebnisse liefern eine ähnliche Verteilung von Konformationen wie frühere Studien (Diskussion in den HI, Abb. S3) und legen nahe, dass sich dieser Wert aus verschiedenen Konformationen zusammensetzt, wobei eine teilweise gestreckte Konformation Polyglycin II (PGII oder 3_1 -helix)^[21,34] dominiert. Wir möchten auch die Existenz einer kleinen, aber signifikanten Teilpopulation von Konformationen mit sehr geringem Dipolmoment hervorheben (ca. 1.5-2 mal kleineres Dipolmoment als der Wert beim Maximum der Verteilung; siehe auch unten). Da das Dipolmoment von GGG hauptsächlich durch den Abstand der geladenen Termini bestimmt wird, ordnen wir diese kleinen Dipolmomente Konformationen mit sehr geringen Abständen der C- und N-Termini zu. Die Simulationen zeigen jedoch keine definierte molekulare Konformation die eindeutig diesen niedrigen Dipolmomenten entspricht.

Um nun den Einfluss von Ionen auf die Relaxation des GGG zu untersuchen detektieren wir die dielektrische Relaxation von GGG unter Salzzugabe. Bei diesen Experimenten variieren wir die Salzkonzentration im Bereich $c_{\text{salt}} = 0 - 0.75 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, wobei wir $c_{\text{GGG}} = 0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ konstant belassen. Wie in Abb. 2b für GdmCl zu sehen ist (andere Salze siehe Abb. S4, HI), nimmt mit zunehmender Salzkonzentration die Gesamtamplitude der dielektrischen Spektren ab. Wie bereits aus den experimentellen Daten in Abb. 2b zu erkennen ist, führt eine Änderung des Salzes (bei gegebener Salzkonzentration) zu detektierbaren Unterschieden in der GGG Relaxation, welche die Spektren bei ~ 1 GHz dominiert. Damit zeigen unsere Ergebnisse, dass die Wechselwirkung zwischen Salzen und GGG Ionen-spezifisch ist.

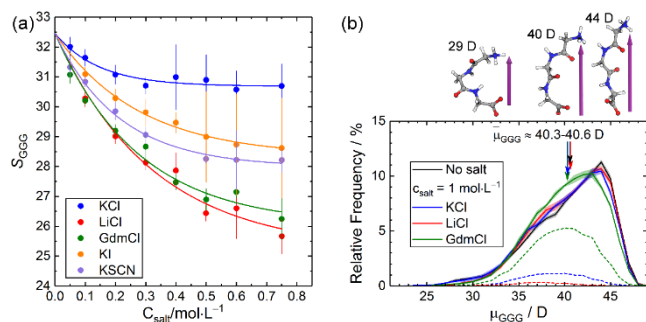


Abbildung 3. (a) Amplitude (S_{GGG}) der Triglycin-Relaxation einer $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ wässrigen Triglycin Lösung als Funktion der Salzkonzentration, wie sie durch Kurvenanpassung der experimentellen Spektren mit Gl. 1 erhalten wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus sechs unabhängigen Messungen. Linien sind nur ein visuelles Hilfsmittel. (b) Verteilungsfunktion des elektrischen Dipolmoments von GGG, wie aus den MD Simulationen eines GGG Zwitterions in reinem Wasser, $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiCl und $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GdmCl (durchgezogene Linien) berechnet. Die Dipolmomente wurden auf Basis der Punktladungen des CHARMM C36m Kraftfeldes berechnet und stimmen gut mit ab initio Rechnungen überein, sogar in Anwesenheit von Li^+ und Gdm^+ (siehe HI). Schattierte Flächen zeigen die Standardabweichung einer Block-Mittelwertbildung. Vertikale Pfeile zeigen die Mittelwerte. Gestrichelte Linien zeigen die Teilpopulationen von GGG Konformationen, bei denen ein Kation gleichzeitig an ein Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe und der Gly-2 Amidgruppe bindet. Des Weiteren sind repräsentative Konformationen mit niedrigem, mittlerem und hohem Dipolmoment gezeigt.

Um die Ionen-spezifischen Effekte auf die GGG Rotation zu quantifizieren, isolieren wir den Beitrag des GGG durch Kurvenanpassung der Spektren mit Gl. 1 (Abb. 2a und Abb. S4-S7, HI). Mit Hilfe der erhaltenen Parametern finden wir eine Verlangsamung der GGG Relaxation bei allen Salzen (Abb. S6, HI). Dieser Anstieg von τ_{GGG} mit zunehmender c_{salt} ist analog zu unseren früheren Beobachtungen für Lösungen von NMA und kann mit der Zunahme der Viskosität mit zunehmender Salzkonzentration in Verbindung gebracht werden.^[14] Die Amplitude der GGG Relaxation S_{GGG} hingegen nimmt bei Salzzugabe ab. Während bei Zugabe von KCl die Amplitude nur moderat abnimmt, zeigen Salze mit Protein-denaturierenden Anionen (KI und KSCN) einen ausgeprägteren Effekt auf S_{GGG} . Die höchste Abnahme von S_{GGG} finden wir für Salze deren Kationen am Rande der Hofmeisterreihe zu finden sind: LiCl und GdmCl (Abb. 3a). Qualitativ stimmen diese Beobachtungen für GGG in Anwesenheit von KI, KSCN, und LiCl mit denen für NMA in Anwesenheit derselben Salze überein.^[14,15,17] Bei Zugabe von KCl finden wir eine leichte Abnahme von S_{GGG} , während der Effekt auf NMA vernachlässigbar war.^[14,15,17] Zusammenfassend ist der Einfluss der meisten Salze mit einer isolierten Amidgruppe in NMA ähnlich dem Effekt auf GGG, welches zwei Amidgruppen und die geladenen Termini enthält. GdmCl bildet hier eine Ausnahme: Während die Rotation von NMA durch GdmCl nur moderat beeinflusst wird,^[14,15,17] ist die Reduktion der Rotationsmobilität von GGG stärker ausgeprägt: GdmCl und LiCl beeinflussen GGG in ähnlichem Maß.

Die gefundene Abnahme von S_{GGG} – die sogenannte Depolarisation – wird oft bei der Zugabe von Salzen zu dipolaren Flüssigkeiten beobachtet und rührt von der Wechselwirkung der Ionen mit molekularen Dipolen her (z.B. den GGG Dipolen). Depolarisation kann im Grunde drei verschiedene molekulare Ursachen haben: (i) Die Bildung von langlebigen Ion-Dipol Kontakten durch Bindung der Dipole^[35] oder die Bildung von Ionenpaaren zwischen den geladenen Termini und den Ionen^[36,37] kann die Rotationsrelaxationsamplitude reduzieren. Eine zweite Ursache für Depolarisation kann im Falle schwächerer Wechselwirkungen (ii) die Kopplung zwischen der Translationsbewegung der Ionen und der Rotationsbewegung der Dipole sein. Eine derartige Kopplung wird auch kinetische Depolarisation (KD) genannt.^[35,38,39] Die dipolaren Moleküle richten sich eher nach dem elektrischen Feld des vorbeiwandernden Ions als nach dem extern angelegten elektrischen Feld aus. Als letzte Option kann eine (iii) Reduktion des molekularen Dipolmoments zur Abnahme der Relaxationsamplitude führen.

Langlebige Kontakte (Möglichkeit (i)) zwischen GGG und den Ionen erscheinen unwahrscheinlich, da sich die chemische Verschiebung der CH_2 Gruppen in den NMR Spektren, welche solche langlebigen Kontakten prinzipiell durch einen nicht-linearen Verlauf mit zunehmender Salzkonzentration nachweisen können,^[19,40] beinahe linear mit der Salzkonzentration ändern (siehe HI, Abb. S8). Eine Reduktion des elektrischen Dipolmoments von GGG (Möglichkeit (iii)) könnte einerseits durch Protonierung/Deprotonierung der endständigen Gruppen hervorgerufen werden, was jedoch unwahrscheinlich erscheint, da die Säurestärke der Termini nur schwach von Salzzugaben abhängt.^[6] Auch eine Änderung der Dipol-Dipol Korrelationen scheint nicht vorzuliegen, da wir schon in Abwesenheit von

Salzen keine Anzeichen für derartige Korrelationen finden (Abb. 1c). Alternativ dazu könnten die Salze die Konformationsgleichgewichte des flexiblen GGG Moleküls^[31–33] durch spezifische Bindungen oder Ionen-spezifische Abschirmung beeinflussen und somit das mittlere Dipolmoment verkleinern. Derartige Konformationsänderungen wurden allerdings für viele einwertige Salze als wenig ausgeprägt eingeschätzt.^[19,20] Nur für LiCl^[21] und SO₃²⁻-Anionen^[20] findet man Belege für Konformationsänderungen von GGG in der Literatur. In unseren Experimenten finden wir eine maximale Abnahme von S_{GGG} um 21.5 %, was einer Verringerung des effektiven mittleren Dipolmoments um ~10 % entsprechen würde.

Um den Beitrag von Konformationsänderung durch Salzzugabe zu unseren Experimenten abzuschätzen, haben wir die MD Simulationen um drei Modellsysteme erweitert (Details in den HI): ein GGG Zwitterion in 1 mol·L⁻¹ Lösungen von LiCl, GdmCl, und KCl. Diese Salze verursachen in der Tat eine Verschiebung der Verteilungsfunktionen der Dipolmomente (Abb. 3b). Obwohl die Verteilungen jedoch durch Salze beeinflusst wird, legen die Simulationen nahe, dass der Mittelwert im Fall von LiCl innerhalb der Fehlergrenze unbeeinflusst bleibt oder im Fall von GdmCl und KCl nur minimal reduziert wird ($\mu_{\text{eff, GGG}} = 40.3 \pm 0.3$ D). Trotz der signifikanten Änderung der Verteilungsfunktion bei GdmCl, kann die marginale Änderung des Mittelwerts durch eine Reduktion der Konformationen mit sehr kleinem Dipolmoment erklärt werden ($\mu_{\text{GGG}} < 32$ D, Abb. 3b). Daher deuten die Simulationen darauf hin, dass eine Reduktion des Dipolmoments von GGG (Möglichkeit (iii)) durch Konformationsänderungen der experimentell beobachteten Reduktion von S_{GGG} ebenfalls nicht zugrunde liegt.

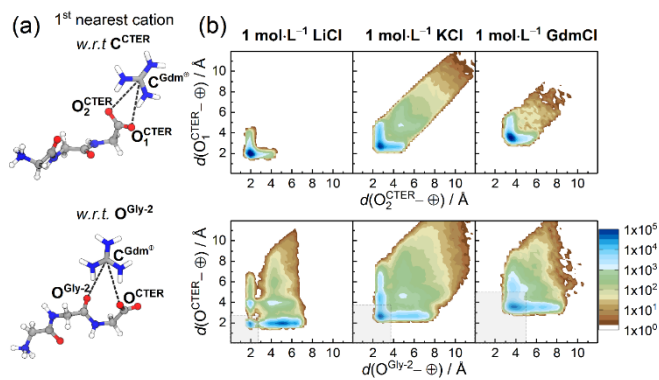


Figure 4. (a) Repräsentative Darstellung zweier dominierender Gdm⁺-GGG Konfigurationen, die in den Simulationen mit GdmCl auftreten (CTER steht für den C-Terminus): Oben: Gleichzeitige Bindung des dem CTER nächsten Kations zu den beiden Sauerstoffatomen des C-Terminus. Unten: Das der Gly-2 Gruppe nächste Kation bindet gleichzeitig an den Sauerstoff der Gly-2 Gruppe und an einen Sauerstoff am CTER. Die relevanten Abstände sind durch gestrichelte Linien dargestellt (b) Kombinierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen des Zentralatoms des erst nächsten Kations als Funktion der Abstände zwischen dem Kation und zweier Sauerstoffatome am GGG (oben: CTER, unten: Gly-2 und CTER), wie aus den MD Simulationen der Lösungen mit 1 mol·L⁻¹ LiCl, KCl und GdmCl erhalten. Schattierte Quadrate zeigen die Auswahlkriterien für die Teilpopulationen, welche in Abb. 3b dargestellt sind.

Daher erscheint kinetische Depolarisation (Möglichkeit (ii)) als wahrscheinlichste Ursache für die beobachtete Abnahme von S_{GGG}. Da kinetische Depolarisation die örtliche Nähe des Kations zu GGG voraussetzt, analysieren wir die Position des dem GGG

nächsten Kations mit Hilfe der MD Simulationen. In Abb. 4 sind die kombinierten Wahrscheinlichkeitsverteilungen als Funktion des Abstands des Zentralatom des Kations von den zwei Sauerstoffatomen des C-Terminus am GGG (obere Reihe in Abb. 4) oder als Funktion des Abstands des Zentralatom des Kations und den Sauerstoffatomen am C-Terminus und der benachbarten Amidgruppe (untere Reihe in Abb. 4) dargestellt. In dieser Darstellung entsprechen Werte auf der Diagonale einer zweizähligen Koordination zu beiden Sauerstoffatomen, während eine Ausdehnung entlang einer Achse auf eine einzählige Bindung schließen lässt.

Im Fall der endständigen COO⁻ Gruppe dominiert die zweizählige Bindungskonfiguration für alle untersuchten Kationen, jedoch mit unterschiedlichen Abstandsverteilungen. Li⁺ und Gdm⁺ sind sehr stark in der Nähe der Carboxylatgruppe lokalisiert. Die mittleren Bindungsabstände zwischen der COO⁻ Gruppe und dem Gdm⁺ Kation sind mit den Abständen von COO⁻ Gruppen und Arginin-Seitenketten in Proteinbindungen (Salzbrücken,^[41] siehe HI) vergleichbar. Diese ähnlichen Abstände deuten auf vergleichbare Bindungsenergien hin und lassen vermuten, dass diese Bindungen bei der Proteindenaturierung eine Rolle spielen. Die Nähe von Li⁺ und Gdm⁺ zur COO⁻ Gruppe liefert auch eine Erklärung für die Reduktion der Konformationen mit geringem Dipolmoment durch diese Salze (Abb. 3b), da eine derartige Anlagerung des Kations die elektrostatische Anziehung der beiden Termini des GGG abschirmt. Insgesamt steht die Nähe von Gdm⁺ und Li⁺ zum C-Terminus des GGG im Einklang mit der beobachteten Abnahme von S_{GGG} durch KD im Fall von GdmCl und LiCl.

Obwohl die negativ geladenen COO⁻ Gruppen am GGG die offensichtlichsten Bindungsstellen für Kationen sind, wurde auch berichtet, dass das Sauerstoffatom an der benachbarten Amidgruppe relevant ist.^[42] Die kombinierte Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Abstände zu einem Sauerstoffatom der endständigen Carboxylatgruppe und zum Sauerstoffatom der Gly-2 Gruppe sind in der untere Reihe in Abb. 4 gezeigt. Ähnlich der Verteilung der Kationen um die Carboxylatgruppe, finden wir hier eine Lokalisierung von Gdm⁺ und Li⁺ in der Nähe dieser beiden Sauerstoffatome, während die Position des nächstgelegenen K⁺ stärker ausgedehnt ist. Bemerkenswerterweise findet sich Li⁺ näher an der Carboxylatgruppe, obwohl wir unsere Auswertung auf das dem Gly-2 Sauerstoffatom nächsten Kation einschränken. Im Gegensatz zu Li⁺ sind die Verteilungen um das C-Terminus und die Gly-2 Gruppe im Fall von Gdm⁺ und K⁺ symmetrischer. Daher können Gdm⁺ Kationen (und weniger ausgeprägt K⁺) gleichzeitig an Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe und der Gly-2 Gruppe mit relativ hoher Affinität binden.

Um diese hohe Affinität des Gdm⁺ hervorzuheben, haben wir die Teilpopulationen (Auswahlkriterien sind als schattierte Quadrate in Abb. 4 dargestellt) dieser Konformationen zu der gesamten Verteilungsfunktion der Dipolmomente berechnet (gestrichelte Linien in Abb. 3b). Alle drei Teilpopulationen sind ähnlich breit verteilt und besitzen ein Maximum bei ~39 D. Die Teilpopulationen machen aber für GdmCl aber 48% aus, während im Fall von KCl und LiCl nur 10.5 % und 2.5 % aller Konformationen diesen Kriterien entsprechen. Daher kann der ausgeprägte Effekt von GdmCl auf die Dipolmomentverteilung in

Abb. 3b und auch die verstärkte kinetische Reduktion von S_{GGG} durch Gdm^+ durch eine derartige Koordination erklärt werden.

Zusammenfassend zeigen unsere experimentellen und simulierten Ergebnisse, dass Salze GGG in Lösung beeinflussen. Der Einfluss auf die Verteilung von Dipolmomenten ist jedoch eher subtil. Wenn man, wie im Fall der DRS, das mittlere Dipolmoment betrachtet, heben sich diese Einflüsse auf. Die experimentell beobachtete Abnahme der Rotationsamplitude des GGG rührt eher von einem kinetischen Effekt her, wobei das Ausmaß der Abnahme mit dem mittleren Abstand zwischen Ion und GGG korreliert. Im Vergleich zu anderen Kationen, wie z.B. Li^+ , deuten unsere Ergebnisse auf eine unterschiedliche Wirkungsweise im Fall des Gdm^+ Kations hin, was im Hinblick auf die hohe Proteindenaturierungsaktivität von Guanidinium Salzen, trotz der niedrigen Oberflächenladungsdichte des Kations, von Interesse ist. Für das außergewöhnliche Gdm^+ Kation zeigen unsere Ergebnisse, dass eine zweizählige Koordination an den C-Terminus und die benachbarte Amidgruppe besonders relevant ist (im Gegensatz zu Li^+ und K^+). Für diese zweizählige Koordination ist das Vermögen des Gdm^+ Kations zwei Wasserstoffbrückenbindungen an zwei unterschiedlichen, örtlich getrennten Stellen auszubilden wahrscheinlich ursächlich^[22] (aufgrund der großen molekularen Dimensionen des Gdm^+). Obwohl viele Eigenschaften von Gdm^+ - Elektrolyten denen von Na^+ - Elektrolyten ähneln,^[43–45] und obwohl auch die Wechselwirkung mit einer isolierten Amidgruppe nur moderat ist,^[15] legen unsere Ergebnisse nahe, dass das zweizählige Bindungsmotiv in Zusammenhang mit der hohen Proteindenaturierungsaktivität steht,^[46] da diese Bindung die GGG Konformation nachhaltig beeinflusst. In dieser Studie zeigen wir eine derartige Koordination für das C-terminale Ende und die benachbarte Amidgruppe des GGG, das Bindungsmotiv sollte aber auch für das gesamte Proteinerückgrat und für Aminosäuren mit Carboxylatgruppen an der Seitenkette eine Rolle spielen. Die erwähnten Carboxylatgruppen der Seitenketten tragen nämlich zu starken intramolekulare Bindungen bei,^[41] welche die tertiäre Struktur von Proteinen stabilisieren.

Danksagung

Diese Studie wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) HU1860/4 und durch das Horizon-2020-Programm der Europäischen Union (Fördervertrag n°714691) gefördert. B.M. bedankt sich bei der Alexander von Humboldt Stiftung für finanzielle Unterstützung.

Keywords: Hofmeistereffekte • dielektrische Spektroskopie • Triglycin • Proteindenaturierung • Molekulardynamik Simulation

- [1] M. Manciu, E. Ruckenstein, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *105*, 63–101.
 [2] Y. Zhang, S. Furyk, D. E. Bergbreiter, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14505–14510.
 [3] E. A. Algaer, N. F. A. van der Vegt, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13781–13787.
 [4] A. M. Jubb, W. Hua, H. C. Allen, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 110–119.
 [5] P. Bauduin, A. Renoncourt, D. Touraud, W. Kunz, B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9*, 43–47.
 [6] M. Boström, D. R. M. Williams, B. W. Ninham, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 686–694.
 [7] A. Salis, B. W. Ninham, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7358–7377.

- [8] P. Jungwirth, P. S. Cremer, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 261–263.
 [9] Y. Zhang, P. S. Cremer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 15249–15253.
 [10] H. I. Okur, J. Hladílková, K. B. Rembert, Y. Cho, J. Heyda, J. Dzubiella, P. S. Cremer, P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 1997–2014.
 [11] H. I. Okur, J. Kherb, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5062–5067.
 [12] J. Hladílková, 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.
 [13] H. Kim, H. Lee, G. Lee, H. Kim, M. Cho, *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 124501.
 [14] V. Balos, M. Bonn, J. Hunger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 28539–28543.
 [15] V. Balos, H. Kim, M. Bonn, J. Hunger, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 8125–8128.
 [16] C. P. Rao, P. Balaram, C. N. R. Rao, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **1980**, *76*, 1008–1013.
 [17] V. Balos, M. Bonn, J. Hunger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 1346–1347.
 [18] V. Balos, M. Bonn, J. Hunger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 9724–9728.
 [19] 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.
 [20] C. P. Schwartz, J. S. Uejio, A. M. Duffin, A. H. England, D. N. Kelly, D. Prendergast, R. J. Saykally, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 14008–14013.
 [21] S. Bykov, S. Asher, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6636–6641.
 [22] J. Heyda, H. I. Okur, J. Hladílková, K. B. Rembert, W. Hunn, T. Yang, J. Dzubiella, P. Jungwirth, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 863–870.
 [23] V. Balos, Specific Ion Effects on Protein Fragments - A Dielectric Spectroscopy Study, PhD Thesis, University of Amsterdam, **2017**.
 [24] F. Kremer, A. Schönhals, *Broadband Dielectric Spectroscopy*, Springer, Berlin, **2003**.
 [25] T. Fukasawa, T. Sato, J. Watanabe, Y. Hama, W. Kunz, R. Buchner, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 197802.
 [26] T. Sato, R. Buchner, Š. Fernandez, A. Chiba, W. Kunz, *J. Mol. Liq.* **2005**, *117*, 93–98.
 [27] I. Rodriguez-Arteche, S. Cerveny, Á. Alegria, J. Colmenero, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 11352–11362.
 [28] C. F. J. Böttcher, *Theory of Electric Polarization*, Elsevier, Amsterdam, **1978**.
 [29] E. A. S. Cavell, P. C. Knight, M. A. Sheikh, S. M. A., M. A. Sheikh, *Trans. Faraday Soc.* **1971**, *67*, 2225–2233.
 [30] J. Hunger, A. Stoppa, A. Thoman, M. Walther, R. Buchner, *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *471*, 85–91.
 [31] R. B. Best, X. Zhu, J. Shim, P. E. M. Lopes, J. Mittal, M. Feig, A. D. MacKerell, *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 3257–3273.
 [32] J. A. Drake, B. M. Pettitt, *J. Comput. Chem.* **2015**, *36*, 1275–1285.
 [33] J. Graf, P. H. Nguyen, G. Stock, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1179–1189.
 [34] R. Schweitzer-Stenner, F. Eker, Q. Huang, K. Griebenow, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9628–9633.
 [35] N. Ottosson, J. Hunger, H. J. Bakker, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12808–12811.
 [36] A. Eiberweiser, A. Nazet, S. E. Kruchinin, M. V. Fedotova, R. Buchner, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 15203–15211.
 [37] S. T. van der Post, J. Hunger, M. Bonn, H. J. Bakker, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4397–4403.
 [38] J. B. Hubbard, L. Onsager, W. M. van Beek, M. Mandel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 401–404.
 [39] M. Sega, S. Kantorovich, A. Arnold, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 130–133.
 [40] K. B. Rembert, H. I. Okur, C. Hilty, P. S. Cremer, *Langmuir* **2015**, *31*, 3459–3464.
 [41] H. Meuzelaar, M. R. Panman, S. Woutersen, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54*, 15255–15259.
 [42] S. J. Ye, P. B. Armentrout, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 3587–3596.
 [43] Y. Marcus, *J. Chem. Thermodyn.* **2012**, *48*, 70–74.
 [44] J. Hunger, R. Neueder, R. Buchner, A. Apelblat, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 615–622.
 [45] J. Hunger, S. Niedermayer, R. Buchner, G. Hefter, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13617–13627.
 [46] P. H. Von Hippel, K. Y. Wong, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3909–23.