

Kemi for tiden

Mærk varmen!

– en historie om moderne kalorimetri

Af Christa Trandum, Kemisk Institut, Syddansk Universitet, christa@memphys.sdu.dk
og Peter Westh, Institut for Biologi og Kemi, Roskilde Universitetscenter, pwesth@ruc.dk

Verden omkring os er i stadig forandring. Både levende organismer og døde ting skifter bestandigt mellem forskellige former og mønstre, og strukturer dannes og nedbrydes. Vand fryser til is eller fordamper, for senere at fortætte sig igen og falde som regn. Det døde stof organiserer sig i levende celler og organismer for senere at nedbrydes igen. Orden opstår for dernæst at afløses af uorden og kaos, hvorefter orden igen kan opstå. Naturen er tilsyneladende drevet af kræfter, som bestandigt forskyder balancen mellem orden og uorden. Denne balance er helt afgørende for al biologisk aktivitet, og en forståelse af samspillet mellem de fysiske og kemiske kræfter, der ligger til grund for balancen, er derfor afgørende for at opnå indsigt i mekanismerne bag biologiske systemers dannelse, struktur og funktion.

En af de teknikker, der gennem de sidste 20 år har bidraget betydeligt til forståelsen af mekanismerne bag en række biologiske og biokemiske fænomener er *mikrokalorimetri*. Ved hjælp af et mikrokalorimeter er det nemlig muligt at måle energiforbruget eller den energi, der bliver frigivet ved en kemisk eller biologisk proces, og dermed opnå indsigt i størrelsen og naturen af de kræfter, der driver processerne. I store træk er der to typer mikrokalorimetre, der i dag har vundet stor udbredelse, *Differential Scanning Calorimetri (DSC)* og *Isoterm Titrer Calorimetri (ITC)*. I det følgende skal vi se nærmere på, hvorledes mikrokalorimetri kan bruges til at undersøge en række orden-uorden processer, der har betydning for udvalgte biologiske systemers struktur og funktion. Specielt skal vi se på den energiomsætning, der skal bruges til at nedbryde strukturen af et biologisk aktivt protein, og den energi, der frigives, når to DNA-strenger bindes til hinanden.

Mikrokalorimetrisk teknik

Helt generelt gælder det, at den effekt, P , der afsættes i et system ganget med tiden, Δt , er lig med varmetilførslen, q , til systemet

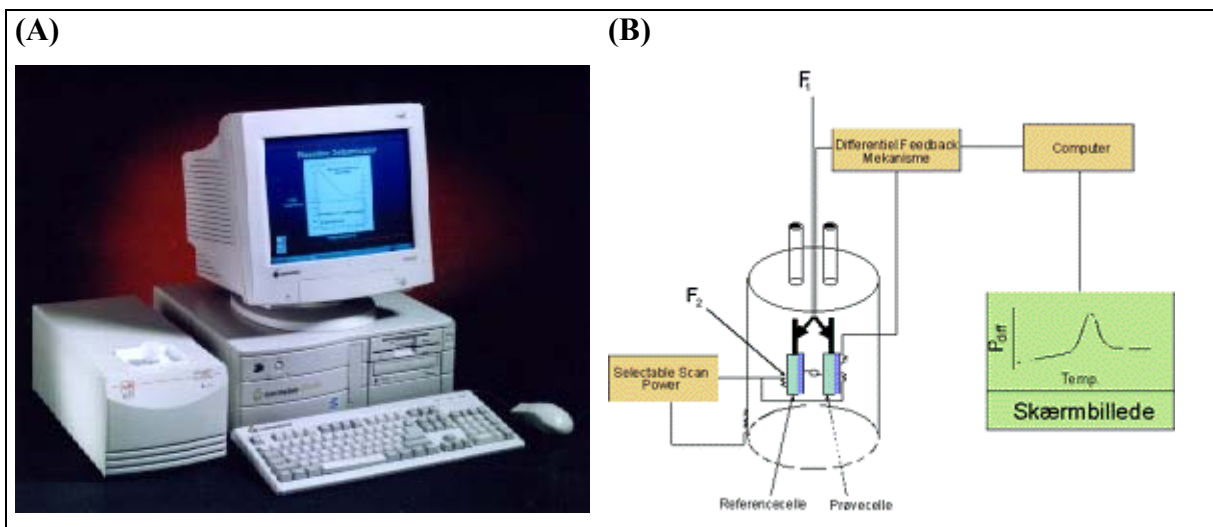
$$q = P \cdot \Delta t \quad (1)$$

Et system, der tilføres varme, vil enten undergå en temperaturstigning, eller temperaturen vil forblive konstant mens systemet (eller dele af systemet) skifter tilstandsform. Hvis der ikke sker ændringer i systemets tilstandsform, gælder det, at den tilførte varmemængde, q , er proportional med temperaturstigningen ΔT , (hvis trykket holdes konstant er varmetilførslen, q , lig med systemets entalpiændring, ΔH)

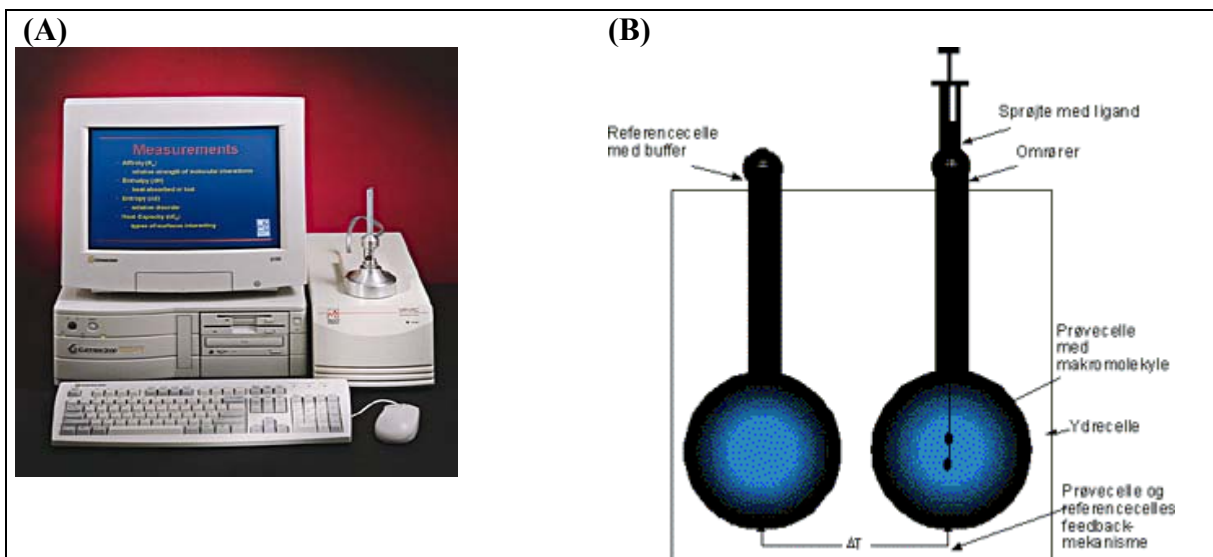
$$q = C \cdot \Delta T \quad (2)$$

Proportionalitetskonstanten C kaldes *varmekapaciteten* og har enheden J/K. Den er et mål for, hvor godt et stof er til "at holde på varmen". Disse to ligninger danner tilsammen hele det principielle grundlag for forståelsen af de to mest udbredte mikrokalorimetrisk teknikker,

DSC og ITC. Det eksperimentelle udgangspunkt for mikrokalorimetri er derfor et meget fintfølede termometer.



Figur 1 a) DSC-kalorimeter. **b)** Skitsetegning af et DSC-kalorimeter. I prøvecellen anbringes en opløsning af biologisk materiale og referencecellen fyldes med rent opløsningsmiddel (oftest vand). Temperaturen af de to celler reguleres ved hjælp af to varmelegemer, F_1 og F_2 . Varmelegeme 1 tilfører nøjagtigt samme mængde varme til prøve- og referencecelle og reguleres således at referencens temperatur stiger lineært med tiden. Når temperaturen har nået en værdi, hvor materialet i prøvecellen begynder at undergå en termisk induceret strukturel ændring, vil der opstå en temperaturforskel mellem de to celler. Varmelegeme 2 vil da tilføre ekstra varme til prøvecellen, således at temperaturforskellen mellem de to celler kompenseres.



Figur 2 a) ITC-kalorimeter. **b)** Skitsetegning af et ITC-kalorimeter. Kalorimeteret består af to celler, en prøvecelle og en referencecelle, der er indsat i en termostateret kappe, og en injektionssprøjte. Et forsøg udføres ved, at en lille mængde titrator fra injektionssprøjten gentagne gange og med samme tidsinterval tilsættes titranden i prøvecellen. Kalorimeteret registrerer den varmeændring, associationen mellem titrator og titrand forårsager. Hvis blandingsprocessen er exoterm vil temperaturen i prøvecellen stige en lille smule i forhold til temperaturen i referencecellen, og omvendt vil temperaturen i prøvecellen være lavere end i referencecellen, hvis blandingsprocessen er endoterm.

DSC benyttes til at bestemme størrelsen af de kræfter, der ligger til grund for termisk inducerede reaktioner som faseovergange (f.eks. vand/is), foldning/udfoldning af biologiske strukturer (proteiner og DNA) og dannelse af molekulære aggregater (miceller). I praksis gøres dette ved at ændre temperaturen i to identiske celler (se figur 1), en forsøgscelle og en referencecelle, med en bestemt hastighed ($^{\circ}\text{C}/\text{time}$) og således måle, hvor stor effekt der skal afsættes i systemet for at hæve temperaturen et vist antal grader.

ITC kan siges at være en komplementær metode til DSC. ITC benyttes nemlig til ved en fastholdt temperatur at undersøge koncentrationsinducerede reaktioner så som binding af en ligand til et protein og dannelse af miceller (dannelse af molekulære komplekser).

Resultatet af et DSC-forsøg kaldes et termogram. Termogrammet vil vise forskellen i specifik varmekapacitet mellem prøveopløsningen ($C_{\text{prøve}}$) og en reference (vand eller buffer) (C_{vand}) som funktion af temperaturen. Ved en analyse af termogrammet kan man bestemme en række fysiske parametre, som f.eks. smeltepunkt og smeltevarme. På tilsvarende måde kaldes resultatet af et ITC-forsøg, et entalpogram (varmeændringen som funktion af tiden angivet i μW ($\mu\text{J/s}$) afbildes). Ved brug af entalpogrammet kan man bl.a. indhente information om bindingskonstanter, antallet af bundne titrermolekyler og entalpiændringen for blandingsprocessen. De forskellige anvendelsesområder for henholdsvis DSC og ITC og de fysiske parametre teknikkerne giver adgang til er samlet i figur 3.

DSC	ITC
<ul style="list-style-type: none"> Sanningskalorimeter Termisk inducerede reaktioner 	<ul style="list-style-type: none"> Titreringskalorimeter Koncentrationsinducerede reaktioner
$[A] \leftrightarrow [B]$	$[A] + [B] \leftrightarrow [AB]$ <p>eller</p> $[A] + [A] \leftrightarrow [A_2]$
<ul style="list-style-type: none"> Eksømpler <ul style="list-style-type: none"> 1. Faseovergange $\text{H}_2\text{O} (s) \leftrightarrow \text{H}_2\text{O} (l)$ 2. Denaturation $\text{protein} (N) \leftrightarrow \text{protein} (D)$ 	<ul style="list-style-type: none"> Eksømpler <ul style="list-style-type: none"> 1. Binding af ligand til protein $[P] + [L] \leftrightarrow [PL]$ 2. Micelledannelse $\text{unimer} \leftrightarrow \text{micelle}$
<ul style="list-style-type: none"> Eksperimentel variabel <i>Temperaturen</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Eksperimentel variabel <i>Koncentrationen</i>
<ul style="list-style-type: none"> Eksperimentel øbservabel <i>Varmekapaciteten</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Eksperimentel øbservabel <i>Varmetøningen</i>
<ul style="list-style-type: none"> Tilgængelige parametre <ul style="list-style-type: none"> - T_m smelte temperaturen - ΔH for reaktionen - ΔC_p for reaktionen - Ved brug af modeller kan ΔG, ΔS og K for 	<ul style="list-style-type: none"> Tilgængelige parametre <ul style="list-style-type: none"> - ΔH for reaktionen - Ved brug af modeller kan ΔG, ΔS, K og n (n er antallet af bindingssites) for reaktionen bestemmes

Figur 3 Anvendelsesområder for henholdsvis DSC og ITC.

Faseovergang i æggehvidestoffer

En vigtig gruppe af store molekyler i levende organismer er proteinerne. Hver enkelt celle i en levende organisme indeholder mange tusind forskellige proteiner, der kan grupperes efter deres funktion. Strukturproteinerne opbygger cellerne og deres organeller, transportproteinerne bringer ilt og andre små molekyler rundt i kroppen, hormonerne regulerer bl.a. blodsukkerkoncentrationen og mælkeproduktionen, og enzymerne styrer alle kroppens stofskifteprocesser. For at proteinerne skal fungere optimalt og udføre deres biologiske funktioner kræves det dog, at en række ydre parametre som temperatur, ionstyrke og pH er optimale. I det følgende vil vi se på, hvordan man ved hjælp af DSC kan undersøge stabiliteten af proteiner, og specifikt skal vi se på hvordan man kan beskrive den overgang fra orden til uorden, som sker i lysozym, når det bliver varmet op (lysozym er et protein, der findes i stor mængde i hønseæggehvide og hvis funktion er at binde polysaccharider og nedbryde dem. Strukturændringer i lysozym under opvarmning er hovedårsagen til, at æggehvide stivner på en varm stegepande).

Proteiner er komplicerede makromolekylære strukturer, der er opbygget af en kæde af aminosyrer. Aminosyrekæden syntetiseres i cellen og opfoldes efter syntesen spontant til en specifik rumlig struktur, der er karakteristisk for det givne protein. Denne struktur, der kaldes proteinets *native konformation*, er bestemt af antallet og rækkefølgen af aminosyrer i kæden. Lysozym består af en kæde af 109 aminosyrer, der er foldet til en næsten kugleformet struktur, som vist i figur 4.

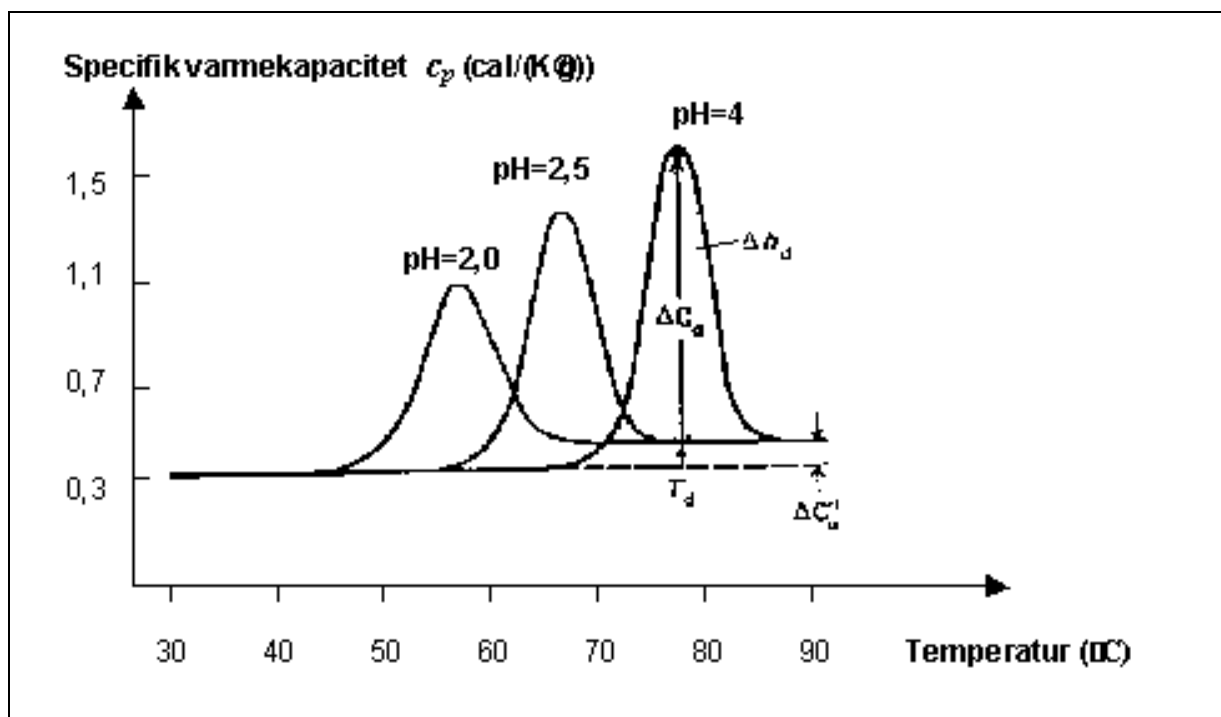


Figur 4 Tredimensional struktur af lysozym fra hønseæggehvide. Kun rygraden i aminosyrekæden er vist.

Den biologiske aktivitet af såvel lysozym som de fleste andre proteiner er betinget af dannelsen af den rette native konformation. Forskellige proteiner har forskellige strukturer, men generelt er de tætpakkede og ordnede, med de enkelte aminosyrer i proteinmolekylet

placeret i faste positioner i forhold til hinanden. Da den native konformation imidlertid kun er én blandt et i princippet uendelig stort antal konformationer et protein kan indtage, så er stabiliteten af den native proteinkonformation et godt eksempel på, hvordan balancen mellem orden og uorden i naturen er af afgørende betydning for biologisk aktivitet.

På figur 5 er vist et termogram. Det viste termogram er resultatet af tre kalorimetriske forsøg, hvor æggehvite lysozym ved tre forskellige pH-værdier udfoldes ved at ændre temperaturen. Figuren viser forskellen i den specifikke varmekapacitet mellem lysozymopløsningen (c_{lysozym}) og vand (c_{vand}) som funktion af temperaturen.

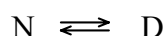


Figur 5 Termogram for udfoldningen af lysozym. Termogrammet er fremkommet ved at bruge et kalorimeter magen til det beskrevet i figur 1.

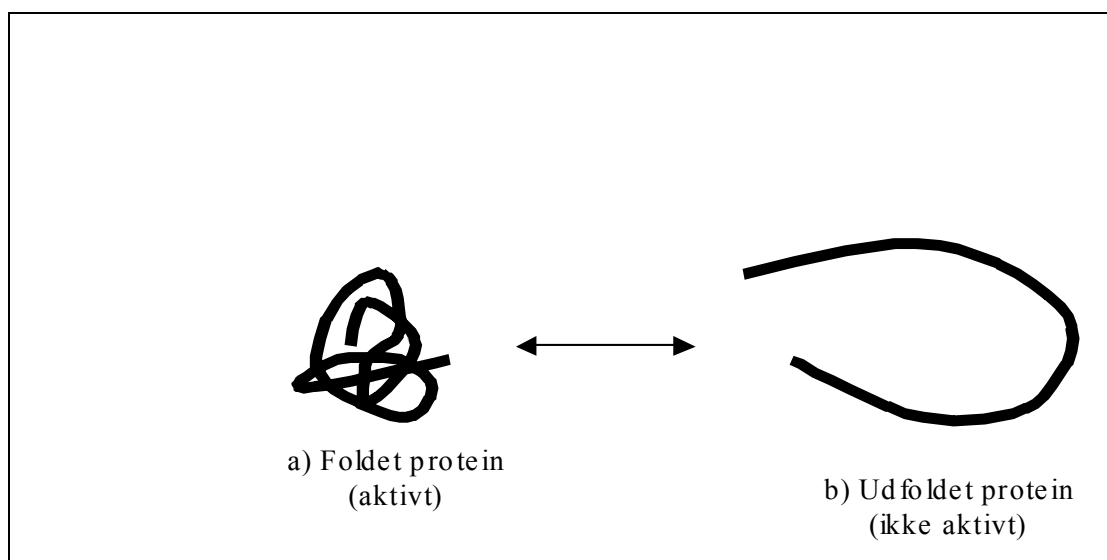
Vi kan umiddelbart se, at der skal tilføres en forskellig mængde varme til de to celler (prøve- og referencecellen) for at holde temperaturforskellen mellem dem lig nul (hvis vi skulle have tilført lige meget varme til de to celler, ville vi blot have fået en ret linie gennem hele temperaturintervallet). Forskellen i varmetilførsel til de to celler afspejler den ekstra mængde varme, der skal bruges til at bringe lysozym fra dets foldede, native konformation til en udfoldet, denatureret form. Som vi så i ligning 2 er den tilførte varmemængde, q , proportional med temperaturstigningen, ΔT . Ved passende valg af integrationsgrænser kan vi derfor bestemme arealet under varmekapacitetskurven og dermed beregne entalpiændringen, ΔH , for processen ($q = dH = \int c dT$). Vi kan også se, at varmekapaciteten af proteinopløsningen stiger efter udfoldningen (Δc er positiv) og endelig kan "smeltetemperaturen" eller denatureringstemperaturen aflæses. Denatureringstemperaturen er den temperatur, hvor præcis halvdelen af proteinet er udfoldet. For de tre forsøg er det tilfældet ved henholdsvis $T = 56^\circ\text{C}$, $T = 67^\circ\text{C}$ og $T = 79^\circ\text{C}$. Denatureringstemperaturen og dermed stabiliteten af lysozym er altså afhængig af pH-værdien.

Ved at tage udgangspunkt i den såkaldte to-trins model er det muligt at give en nøjere fysisk-kemisk beskrivelse af vandopløselige proteins stabilitet. To-trins modellen bygger på en antagelse om, at proteinmolekyler i vandig opløsning kun kan eksistere i to tilstande, N, den native konformation, og D, den denaturerede konformation, som er i indbyrdes ligevægt.

Denne model har vist sig realistisk for mange vandopløselige proteiner, hvor ligevægt indtræder på en tidsskala fra 10 til 100 msek



Den denaturerede form af et protein kan beskrives som en uordnet, tilfældig kæde, og er ikke defineret som en specifik konformation men en summation over alle de mulige konformationer proteinet kan antage, der ikke er N-konformationen. I denne tilstand har proteinet mistet sin biologiske aktivitet (figur 6).



Figur 6 Skematisk illustration af (a) et foldet biologisk aktivt protein og (b) et denatureret protein.

Denne reaktion er karakteriseret ved ligevægtskonstanten

$$K = \frac{[D]}{[N]} = \frac{\alpha}{(1-\alpha)} \quad (3)$$

hvor α betegner den brøkdelen af proteinmolekylerne, der befinder sig i D-tilstanden (denatureringsgraden). Når alle proteinmolekylerne findes i deres native konformation er $\alpha=0$, og når samtlige proteinmolekyler er denaturerede er $\alpha=1$. Da varmekapacitetskurven giver information om, hvor stor en brøkdelen af lysozym, der er udfoldet ved en given temperatur, kan den bruges til at bestemme ligevægtskonstanten og dens temperaturafhængighed (og dermed også ændringen i standard Gibbs energi, ΔG^\ominus , da $\ln K = -\Delta G^\ominus/RT$). Videre kan denatureringsentalpien bestemmes ud fra ligevægtskonstantens temperaturafhængighed ved at afbilde $\ln K$ som funktion af T^{-1} (van't Hoff's ligning)

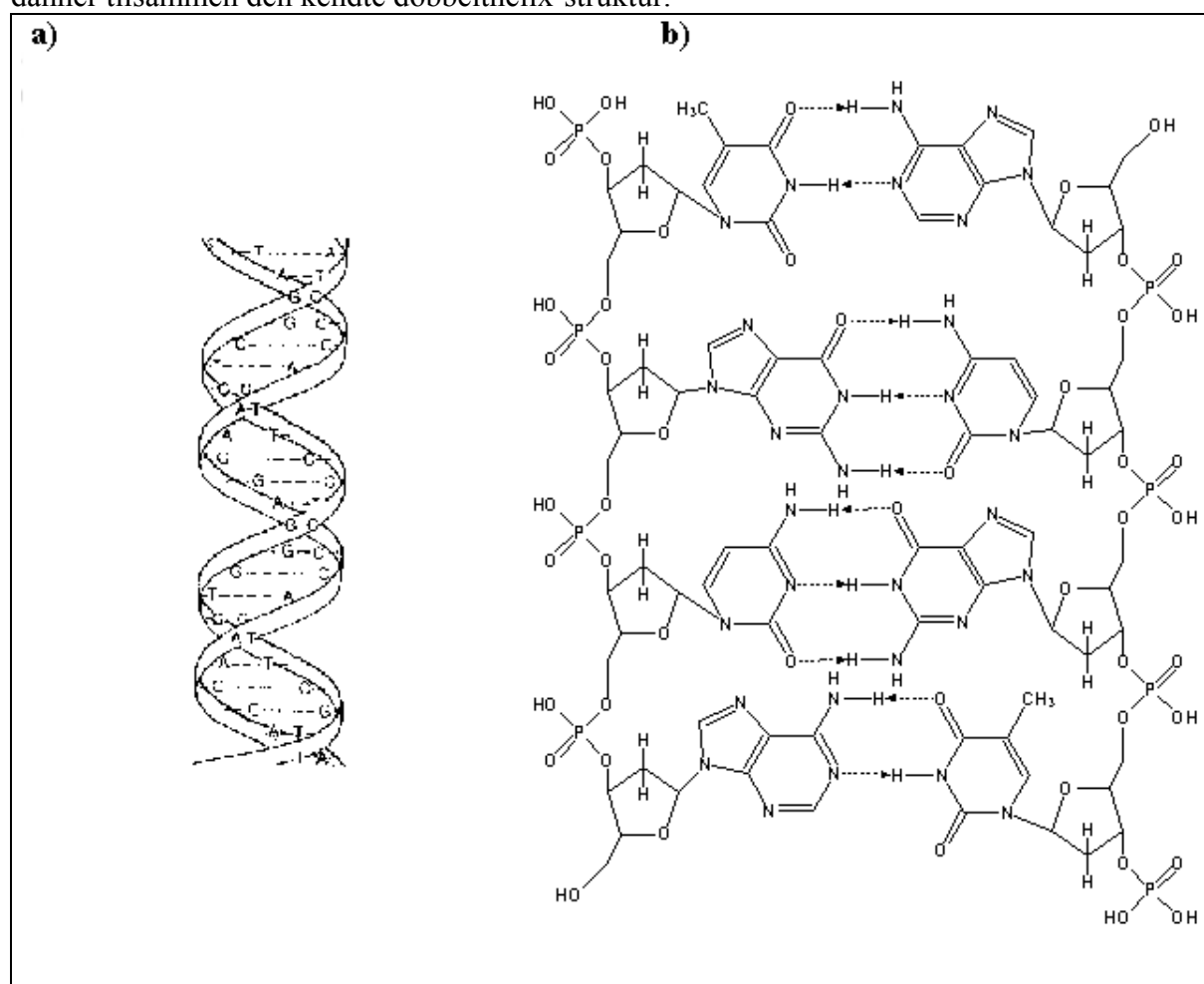
$$\left(\frac{d \ln K}{dT} \right) = \frac{\Delta H^\ominus}{RT^2} \quad (4)$$

og endelig kan man også bestemme entropiændringen, ΔS^\ominus , for udfoldningsprocessen ud fra $\Delta G^\ominus = \Delta H^\ominus - T\Delta S^\ominus$. For eksempel 1 (pH=2), figur 5, finder man således at $\Delta H^\ominus = 250$ kJ/mol og $\Delta S^\ominus = 0.8$ kJ/mol K ved smeltepunktet. Den native proteinkonformation er altså fra et entropimæssigt synspunkt ufavorabel (proteinet har en ordnet struktur). På den anden side er det energimæssigt meget dyrt (ΔH^\ominus er positiv) at bryde de mange hydrogenbindinger, der dels er mellem aminosyrerne (byggestenene i proteiner) indbyrdes og dels er i

opløsningsmidlet (vand), for at gøre plads til det udfoldede protein. Sammenligner man i øvrigt entalpien bestemt direkte ved integration af arealet under kurverne i figur 5 med entalpien bestemt ved hjælp af ligning 4 vil man få information om gyldigheden af to-trins modellen (de to entalpier skal være lige store, hvis modellen skal siges, at give et acceptabelt billede af foldningsprocessen).

Stabilitet af DNA

DNA (deoxyribonucleinsyre) udgør det molekylære grundlag for biologisk arvelighed. Et DNA molekyle er en uforgrenet polymer, der består af enheder betegnet deoxynucleotider. Der findes fire slags nucleotider, der igen er opbygget af tre molekyler. Alle nucleotider indeholder et carbohydrat med 5 C-atomer (deoxyribose) og en fosfatgruppe. Derudover indeholder nucleotiderne én af de fire baser adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og thymidin (T). Imidlertid består en DNA-streng ikke blot af en lang nucleotidkæde, men af en dimer, dvs. to nucleotidkæder, der ligger over for hinanden (se figur 7a). Disse nucleotidkæder danner tilsammen den kendte dobbelthelix-struktur.



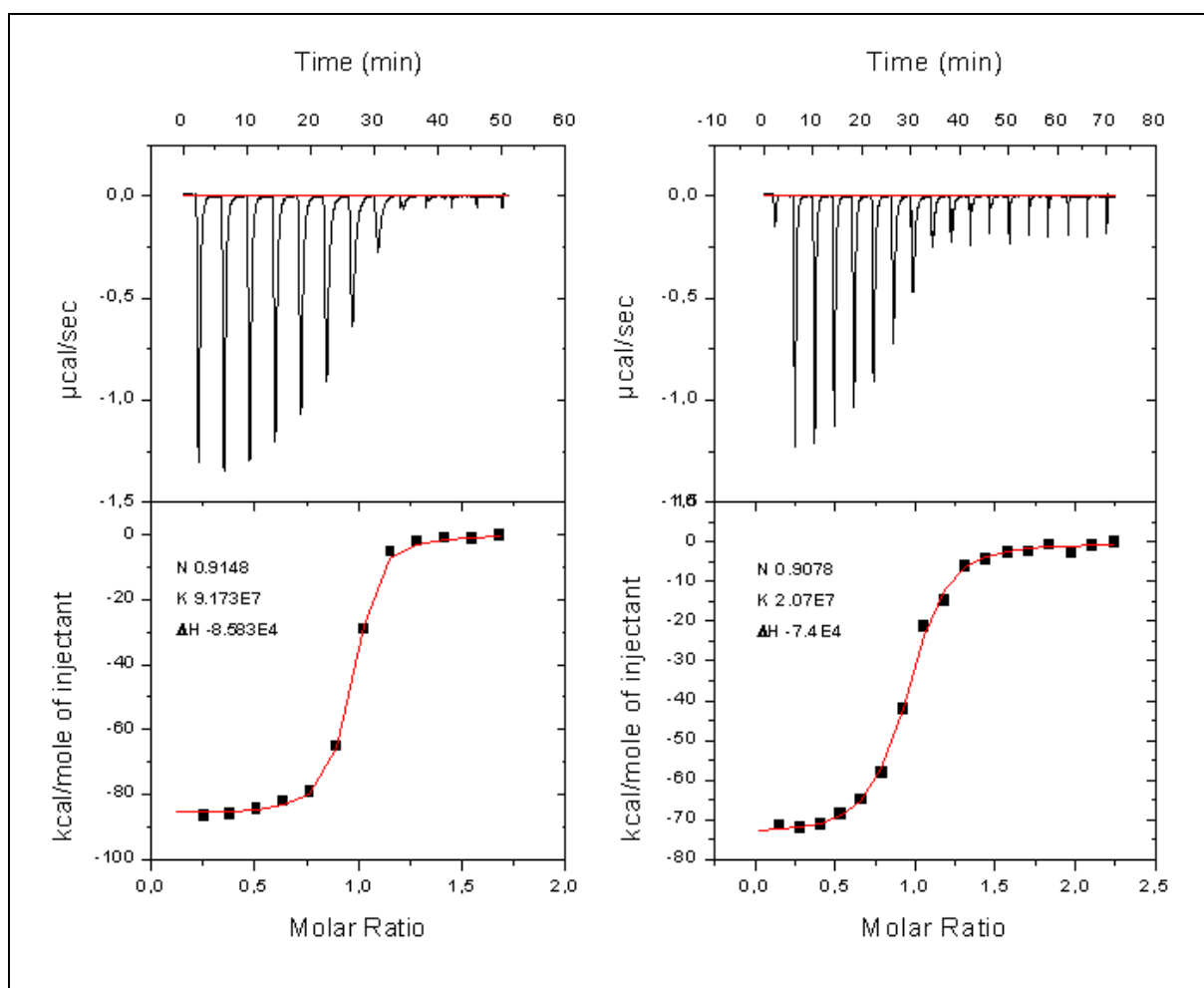
Figur 7 (a) DNA-molekylets dobbelthelix. **(b)** Hydrogenbindingerne (vist som stiplede pile) i dobbeltstrengen i DNA.

Stabiliteten af dobbelthelix-strukturen er betinget af dannelsen af hydrogenbindinger mellem basepar i hver af de to nucleotidkæder. Der kan således dannes to hydrogenbindinger mellem A og T (et A-T basepar) og tre hydrogenbindinger mellem C og G (et C-G basepar). Dette er illustreret figur 7b. Associationen (eller dimeriseringen) af to DNA-kæder kan beskrives ved følgende ligevægt



hvor K er ligevægtskonstanten, og ΔH er entalpiændringen for reaktionen. I det følgende skal vi se to eksempler på, hvordan ITC kan benyttes til at undersøge bindingsstyrken for dimeriseringen af stykker af syntetisk fremstillede DNA-kæder.

I det første forsøg er der benyttet to DNA-kæder, DNA1 og DNA2, som er fuldstændig komplementære. Det betyder, at samtlige nucleotider kan danne et optimalt antal hydrogenbindinger (A=T) og (C≡G). I det andet forsøg benyttes DNA2 og DNA3. Den eneste forskel på DNA1 og DNA3 er en udskiftning af et nucleotid i midten af DNA1 (en C-base er skiftet ud med en A-base). En dimer mellem DNA2 og DNA3 kan altså ikke længere danne det optimale antal hydrogenbindinger på den plads, hvor nucleotidudskiftningen har fundet sted. figur 8, øverste kolonne, viser resultatet af de to ITC-forsøg. I begge forsøg er prøvecellen blevet fyldt med en opløsning af DNA2 og injektionssprøjten med henholdsvis DNA1 (forsøg 1) og DNA3 (forsøg 3). Der er givet i alt 13 injektioner a 15µL med 4 minutters intervaller i hvert forsøg.



Figur 8 Øverste række: Entalpogram fra ITC-forsøg for (a) DNA1/DNA2 og (b) DNA3/DNA2 dimerdannelsen ved 25 °C. Nederste række: Varmedevkslingen pr injektion (det integrerede areal under hver top) som funktion af titrator-koncentrationen. Den viste kurve er opnået ved ikke-lineær regression.

Arealet under hver top i entalpogrammet svarer til en varmemængde, q , der kan skrives som produktet af stofmængden af dannet AB-kompleks ved injektionen (Δn_{AB}) og den molare entalpitilvækst for reaktionen

$$q = \Delta n_{AB} \cdot \Delta H \quad (5)$$

De beregnede varmemængder er illustreret i figur 8, nederste række. Den første injektion af DNA1 til DNA2 i prøvecellen vil således føre til dimerisering af hele den tilsatte mængde DNA1. Dette gentager sig ved de efterfølgende injektioner indtil mængden af ”frit” DNA2 i prøvecellen begynder at slippe op (dvs. næsten alt DNA2 er bundet i et DNA1/DNA2-kompleks). Herefter vil ikke alt tilsat DNA1 kunne reagere jvf. ligning 5, og injektionstoppe vil derfor blive mindre, indtil mængden af frit DNA2 er helt opbrugt. Den fremkomne S-formede kurve (figur 8, nederste række) indeholder oplysninger om både entalpiændringen for dimeriseringsprocessen og ligevægtskonstanten. Entalpiændringen for processen kan aflæses direkte som højden på ”trinnet” på den S-formede kurve, $\Delta H_1 = -356$ kJ/mol og $\Delta H_2 = -309$ kJ/mol, mens kurvens hældning omkring inflektionspunktet udtrykker K (dette gøres i praksis med computer-hjælp). Bindingskonstanten bliver mere end halveret, blot fordi et nucleotid i kæden udskiftes, idet $K_1 = 9.7 \cdot 10^7$ og $K_2 = 2.2 \cdot 10^7$.

Et sidste ord

Vi har i ovenstående set, at mikrokalorimetri er en uovertruffen teknik til bestemmelse af størrelsen af de kræfter, der dominerer dannelsen af en række biologisk vigtige strukturer. På industrivirksomheder og forskningsinstitutioner rundt om i Danmark er mikrokalorimetri derfor også i dag en udbredt metode til at studere en lang række biologiske og kemiske processer. Ved Institut for Kemi på Roskilde Universitetscenter og MEMPHYS - Center for Biomembranfysik, Syddansk Universitet, Odense, bruges mikrokalorimetri bl.a. til undersøge effekten af alkohol og visse lægemidler på lipiddobbeltlaget i cellemembranen, til at undersøge langtidsstabiliteten af visse proteiner, studere faseovergange i lipidmembraner, undersøge vekselvirkningen mellem vand og antifryseproteiner fra kuldetolerante dyr og til at studere micelledannelsen i syntetisk fremstillede polymere.

Afslutningsvis et par korte tekniske detaljer om moderne mikrokalorimetre. Som navnet antyder benyttes apparaterne til at måle energiomsætninger i *mikrokalorie*-størrelse (μCal eller μJ), hvilket svarer til at man kan måle temperaturændringer i størrelsesordenen $10^{-7} \text{ }^\circ\text{C}$ (altså temperaturændringer mindre end en milliontedel grad). Det svarer til, at man vil kunne registrere temperaturfaldet når man smider en isstump på størrelse med et tændstikhoved i bassinet i en almindelig svømmehal.

Referencer

- 1) *Isothermal titration calorimetry*
E. Freire, O.L. Mayorga and M. Straume, Anal. Chem. Vol.62, no. 18, 950A-959A (1990)
- 2) *High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry in the study of Biomembranes and Related Model Systems*
S. Mabrey and J.L. Sturtevant, Methods in Membrane Biology, pp. 237-274 (1978)
- 3) *Use of Isothermal titration Calorimetry to Study the Interaction of Short-Chain Alcohols with Lipid Membranes*
C. Trandum, P. Westh, K. Jørgensen and O.G. Mouritsen, Thermochim. Acta, vol. 328, pp. 129-135 (1999).

I de sidste 5 år har Kemilærerforeningen (via Kemi Forlaget) i samarbejde med Kemisk Forening og Kemiingeniørgruppen udgivet en række temanumre om **Kemi for tiden**. Disse artikler omhandler aktuelle kemiske emner inden for forskningsverdenen. De første numre kom til verden som pilotprojekter med stor velvilje og økonomisk støtte fra de involverede virksomheder, Kemisk Forening og Kemilærerforeningen. De seneste numre er udgivet som følge af en særbevilling fra **Forskningsministeriet**, denne bevilling er givet for at formidle naturvidenskabelig forskning og viden til gymnasie-, hf- og htx-elever med kemi på højt niveau eller mellemniveau.

Denne artikel er i lighed med tidligere artikler i serien tilgængelig på Kemilærerforeningens hjemmeside:
<http://www.ke.gymfag.dk>