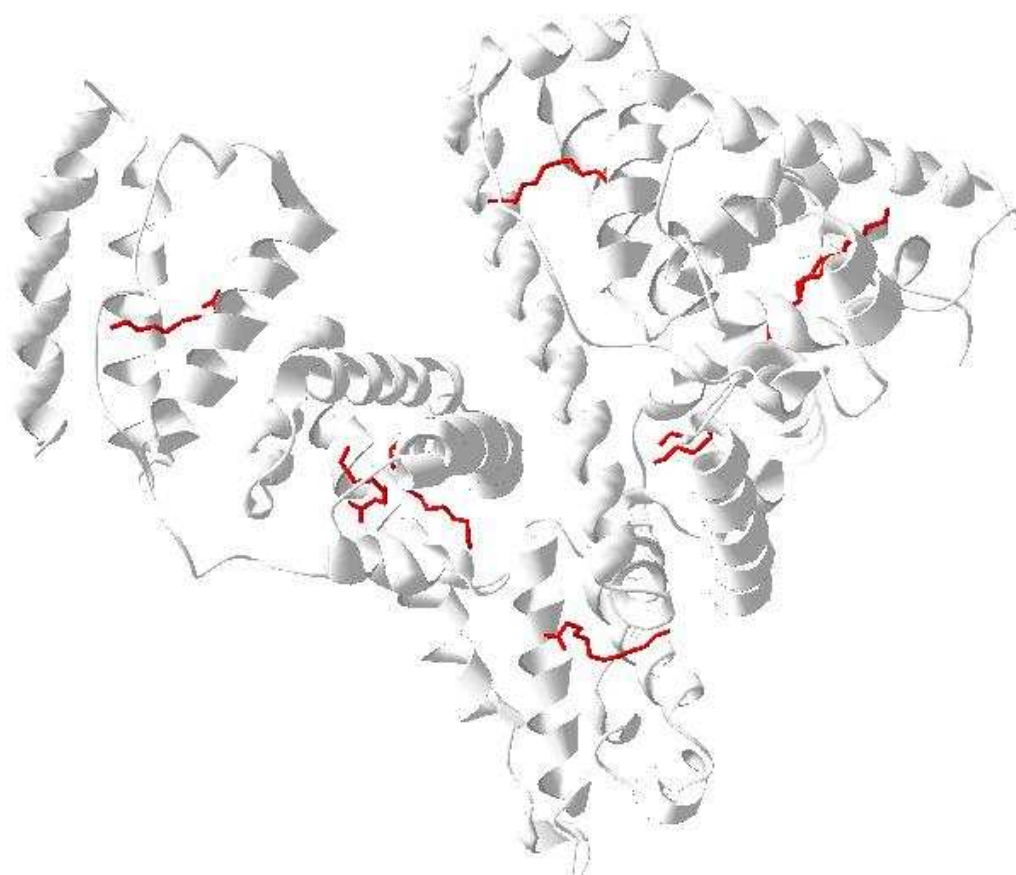


# Bovin serum albumins faser i interaktion med anioniske surfactanter

*The Phases of Bovine Serum Albumin in Interaction with Anionic Surfactants*



Institut for Biologi og Kemi, Roskilde Universitetscenter, foråret 2005

## **Af:**

Louise Slot Christiansen  
Tue Rasmussen  
Anne Dorte Houg  
Rune Andersen Hartvig

## **Vejleder:**

Peter Westh

## Abstract

### Bovin serum albumins faser i interaktion med anioniske surfactanter

Surfactanten sodium dodecylsulfat (SDS) er en kendt denaturant, der blandt andet bruges i SDS polyakrylamid gel elektroforese. I denne rapport undersøges effekten af SDS og to andre relaterede surfactanter, sodium decylsulfat (SDeS) og sodium tetradecylsulfat (STS) på bovin serum albumin (BSA) ved differentiell scanning calorimetry (DSC). Transitions midtpunkter ( $T_m$ ) og transitions enthalpier ( $\Delta H$ ) måles i molforhold intervallerne (surfactant:BSA) 0-190, 0-725 og 0-100 for henholdsvis SDS, SDeS og STS. Dette er for SDS og SDeS langt højere end hidtidige undersøgelser, mens STS er ubeskrevet i litteraturen. Dette er blevet gjort på baggrund af nye ITC resultater, der viser, at BSA, tilsat SDS, kan udfoldes yderligere ved molforhold, hvor det normalt regnes for allerede at være fuldkommen udfoldet. Denne observation undersøges og indgår i en samlet vurdering.

Resultaterne viser, at surfactanternes carbonkædelængde har stor indflydelse på den stabiliserende effekt på BSA med stigende maximum  $T_m$ -værdier ( $T_{m,max}$ ) i rækkefølgen STS<SDS<SDeS. Denne sammenhæng ses ligeledes for surfactant bindingstallet ved  $T_{m,max}$ . De opnåede resultater sammenlignes med andres data og beskrives i separate fasediagrammer for de tre surfactant-BSA systemer. BSA er fundet i tre forskellige konformationer; et nativt stadie, et denatureret stadie og for SDS-BSA systemet et yderligere udfoldet stadie, med et tab af sekundær struktur, formodentlig på grund af elektrostatiske frastødning af de BSA-bundne SDS molekyler. I området af molforhold fra nul til  $T_{m,max}$  observeres et bifase område, hvor denatureringen foregår i to forskellige transitioner. Dette stemmer overens med modellen foreslået af Shrake og Ross.

### The Phases of Bovine Serum Albumin in Interaction with Anionic Surfactants

The surfactant sodium dodecylsulfate (SDS) is a known denaturing agent, for example used in SDS poly-acrylamide gel electroforese procedure. In this paper the effect of SDS and related compounds, sodium decylsulfate (SDeS) and sodium tetradecylsulfate (STS) on bovine serum albumine (BSA) is being studied by differential scanning calorimetry (DSC). Transition midpoints ( $T_m$ ) and transition enthalpies ( $\Delta H$ ) are measured in the range of molar ratios (Surfactant:BSA) of 0-190; 0-725 and 0-100 for SDS, SDeS and STS respectively. These molar ratios are far higher than previous studies of SDS and SDeS, while STS is still undescribed in the literature. These studies are done on the basis of recent ITC results, showing unfolding of BSA, in the presence of SDS, can occur at molar ratios where it is usually considered to be fully unfolded. This observation is further investigated and incorporated in a coherent assessment.

The carbon chain length of the surfactants was found to have a great impact on stabilising effect on BSA, with maximum  $T_m$  ( $T_{m,max}$ ) values increasing in the order STS<SDS<SDeS and likewise for the surfactant binding number at  $T_{m,max}$ . These values are compared with other data and described in separate phase diagrams for the three surfactant-BSA systems. Three distinct conformations of BSA were found; native conformation, denatured state and a further unfolded state are found for SDS in which some of the secondary structure is lost, probably due to electrostatic repulsion among the protein bound SDS. Of further interest a biphasic region was found for molar ratios from zero up to  $T_{m,max}$ , where denaturing takes place in two distinct transitions. The latter finding complies with the model suggested by Shrake and Ross.

## **Indholdsfortegnelse**

Abstract.....	2
1. Forord.....	4
2. Introduktion.....	5
2.1 Bovin serum albumin.....	5
2.2 Surfactanter.....	6
2.3 Surfactanters interaktioner med BSA.....	10
2.4 Effekt af ligandbinding på proteinfoldningens termodynamik.....	11
3. Metode og materialer.....	15
3.1 Materialer.....	17
3.2 Forsøgets udførelse.....	17
3.3 Databehandling.....	17
4. Resultater.....	19
4.1 DSC profil af BSA ved tilstedeværelse af SDeS.....	19
4.2 DSC profil af BSA ved tilstedeværelse af SDS.....	20
4.3 DSC profil af BSA ved tilstedeværelse af STS.....	21
4.4 Eksperimentelle usikkerheder.....	23
5. Diskussion.....	24
5.1 Effekt af surfactant kædelængde på proteinstabilitet.....	24
5.2 Bifase denaturerings modeller.....	25
5.3 Fasediagrammer.....	27
5.4 Fasediagram ved påvirkning af SDS.....	27
5.5 Fasediagram ved påvirkning af STS.....	30
5.6 Fasediagram ved påvirkning af SDeS.....	31
5.7 Komparativ analyse af fasediagrammerne.....	33
6. Konklusion.....	34
7. Referenceliste.....	35
Appendiks A.....	38
Appendiks B.....	39
Appendiks C.....	40
Appendiks D.....	44
Appendiks E.....	46
Appendiks F.....	50

## **1. Forord**

Denne rapport er blevet til efter eksperimentelt arbejde på Roskilde Universitetscenters Institut for Biologi og Kemi i foråret 2005. I den forbindelse vil vi gerne takke Christa Trandum og Bodil Larsen for hjælp i laboratoriet, Lars Lundby Hansen for hjælp i og uden for laboratoriet og Peter Westh for vejledning og inspiration.

Louise, Dorte, Tue og Rune

## **2. Introduktion**

Overflade aktive stoffer, kaldet surfactanter, og deres interaktioner med proteiner har stor interesse indenfor biologisk forskning, heriblandt til opløsning af hydrofobe komponenter [Jones 1992], modulering af proteiners egenskaber og i industrien til brug i proteinprodukter [Kelley 2003]. Surfactanter består i de fleste tilfælde af en hydrofob del, som regel en alkyl kæde, og en hydrofil del. Surfactanter inddeles i to grupper; denaturerende surfactanter og surfactanter, der binder proteinet, men efterlader den tertiære struktur intakt. Ioniske surfactanter regnes normalt som denaturerende, men for nogle anioniske surfactanter er det blevet vist, at der ved lave koncentrationer er en stabiliserende effekt [Yamasaki 1992 og Yamasaki 1996]. Andre faktorer, der spiller ind på proteiners stabilitet, er f.eks. ionstyrke og pH, samt denaturanter som eksempelvis urea [Chi 2003].

I denne rapport undersøges tre anioniske surfactanter sodium decyl sulfate (SDeS), sodium dodecyl sulfate (SDS) og sodium tetradecyl sulfate (STS) med hensyn til deres betydning for stabiliteten af

### **Protein semantik:**

Nativt: Konformation der bibeholder funktion og den tertiære struktur.

Denatureret: Konformation hvor den tertiære struktur er smeltet, men det meste af den sekundære struktur er bibeholdt

Udfoldet: Konformation hvor den tertiære struktur er smeltet og dele af den sekundære struktur desuden er opløst.

-----  
Yderligere findes en oversigt over benyttede forkortelser i [Appendiks F].

Bovin serum albumin (BSA) ved differentiell scanning calorimetry (DSC). Der foreligger allerede publiceret data om SDeS og især SDS-BSA systemer målt med DSC [Yamasaki 1992, Yamasaki 1996, Giancola 1997, Deep 2001 og Kelley 2003]. Disse studier koncentrerer sig om relativt lave surfactant:BSA molforhold, idet dette område har særligt interessante egenskaber [Nielsen 2000], men også på baggrund af at BSA i højere surfactant molforhold menes at være fuldt udfoldet [Yamasaki 1996 og Kelley 2003]. På baggrund af nye isothermal titration calorimetry (ITC) undersøgelser vurderes det, at BSA bundet med SDeS og SDS kan termisk udfoldes yderligere end hidtil ment [Appendiks A]. Ydermere undersøges STS, der

har den længste alifatiske kæde af de tre, efter samme sæt ITC data. Viden om proteiners faser under varierende forhold er sparsomme og spredte. Målet med dette studie er derfor at præsentere fasediagrammer for BSA ved varierende temperaturer og surfactant koncentrationer, hvilket er et skridt på vejen til en bedre forståelse.

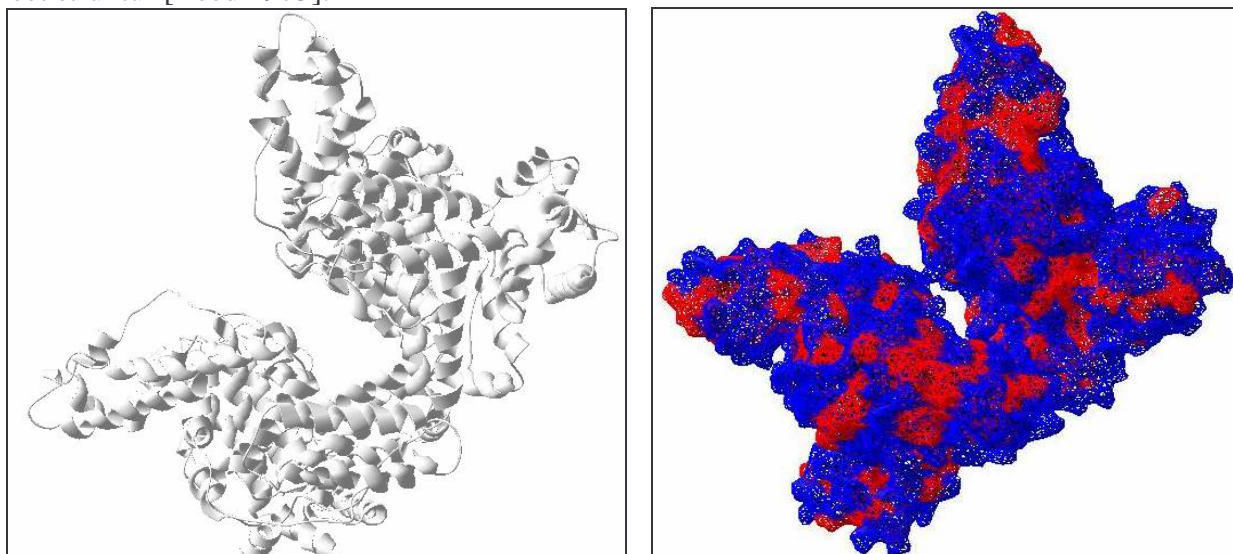
### **2.1 Bovin serum albumin**

Bovin serum albumin (BSA) er et protein, der dannes i leveren [Peters 1950] og cirkulerer i blodplasma. Det binder til en bred vifte af ligander såsom metaller, fedtsyrer, aminosyrer, hormoner og en række af medicinalprodukter [Peters 1985]. I forskning anvendes det som modelprotein, da det er billigt, letopløseligt og har multifunktionelle bindingssites. BSA har 80 % homologi med det humane serum albumin (HSA) [Carter 1994].

BSA vejer 66,7 kDa [Peters 1985] og består af 583 aminosyrer i en enkelt polypeptidkæde [Peters 1996] fordelt på tre forholdsvist ens globulære domæner (I, II og III). BSA stabiliseres af proteinets 35 cysteiner, hvoraf de 34 er bundet i 17 disulfidbroer [Saber 1977]. BSA har derved en enkelt fri cystein, der er beskyttet mod oxidation i BSAs native konformation, men er i stand til at dimerisere med andre BSA-molekyler [Peters 1985].

BSA har en høj totalladning med 185 ioner pr. molekyle ved neutral pH, hvilket bidrager til proteinets høje opløselighed. Nettoladningen er på -18 fordelt med -10 på domæne I, -8 på domæne II og nul på domæne III, hvorved proteinet har en meget negativ N-terminus og en neutral C-

terminus. BSAs sekundære struktur er bestemt til at indeholde omkring 68%  $\alpha$ -helix og 18%  $\beta$ -sheet struktur [Reed 1975].



**Figur. 2.1:** a) Viser den tertiære struktur af HSA med mange  $\alpha$ -helixer. b) Viser van der Waal overfladen på HSA med hydrofobe aminosyrer i rød og hydrofile aminosyrer i blå. Visualiseret udfra krystalstrukturer ved brug af [Deepview].

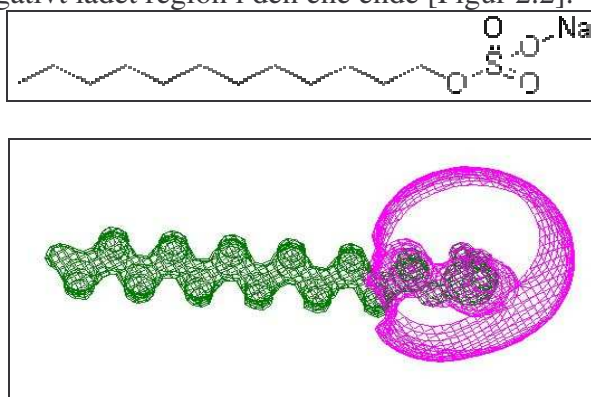
De vigtigste anioniske ligander bindende til BSA er fedtsyrer [Figur 2.1], som transporteres til væv, hvor de dissocieres fra albumin. Lange fedtsyrer ( $C_{16} - C_{20}$ ) som hexadecanoat og octadecanoat er blandt de stærkest bundne organiske ligander [Peters 1996]. Affiniteten for de første to til tre bindingssites på albumin øges som regel med kædelængde [Carter 1994] således at den centrale del af fedtsyren holdes mest fast og enderne kan drejes [Morrisett 1975 og Perkins 1982]. BSA menes at indeholde 2-3 primære bindingssites og 3 eller flere sekundære bindingssites for fedtsyrer [Peters 1996].

Fedtsyrerne dodecanoat, tetradecanoat, hexadecanoat og octadecanoat binder alle HSA i syv sites, mens decanoat binder yderligere to sites [Bhattacharya 2000]. Sudlows site I og II binder begge fedtsyrer [Bhattacharya 2000] og findes begge i HSAs domæner II og III. Sudlows site I binder formodentlig fedtsyrenes carboxylatgrupper gennem saltbroer til aminosyrerne Lys199, Arg218, Arg222, His242 og Arg257 og bl.a. fordi den hydrofobe kløft er mindre end i Sudlows site II er Sudlows site I bindingssite for mellemlange fedtsyrer. Sudlows site II binder derimod alle mellemlange og lange fedtsyrer med hydrogenbindinger til aminosyrerne Arg410, Tyr411 og Ser489 og de lange fedtsyrer med høj affinitet [Bhattacharya 2000]. Der er stor strukturel lighed mellem fedtsyrer og surfactanter og da HSA og BSA har så høj homologi, kan fedtsyrens binding til HSA bruges som model for surfactantbinding til BSA.

## 2.2 Surfactanter

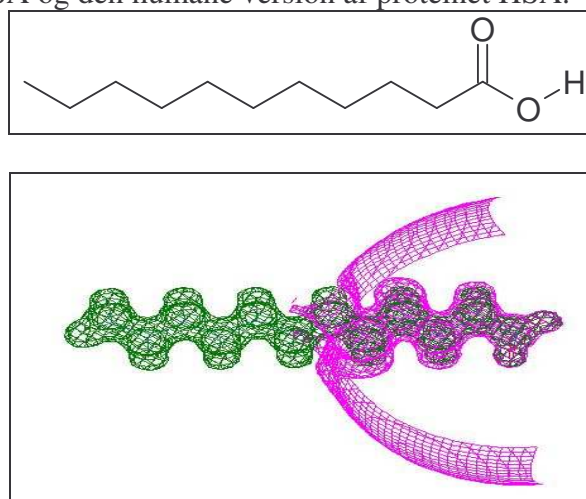
Surfactanter er organiske stoffer med to karakteristiske regioner, en hydrofil, såsom sulfat eller fosfat, og en hydrofob, typisk en lang carbonkæde. De kan opdeles i anioniske, kationiske og nonioniske, hvilket kommer an på om den hydrofile region er henholdsvis negativ ladet, positivt ladet eller nonionisk [Jones 1992]. Begrebet surfactant vil i dette projekt betegne surfactanter med en varierende carbonkæde og en negativt ladet sulfatgruppe, medmindre der gøres opmærksom på andet. Det er tidligt blevet vist, at mange slags surfactanter kan denaturere hæmoglobin [Anson 1939]. Siden er surfactanten sodium dodecyl sulfat (SDS) blevet brugt til denaturering af proteiner

ved SDS-polyacrylamid gel elektroforese, en gængs metode til separation af proteiner efter størrelse. Surfactanter binder uspecifikt til proteinet med den hydrofobe alkylkæde som ligger sig op af hydrofobe aminosyrer. Studier viser, at der kan bindes op til 1,4 gram af surfactanten SDS pr. gram protein i et stort kompleks [Jones 1992]. Bindingen af surfactanter gør, at proteinets native struktur åbnes og flere surfactanter kan bindes [Turro 1995]. Dodecyl sulfat ionens struktur har en lang carbonkæde og en negativt ladet region i den ene ende [Figur 2.2].



Figur 2.2: a, SDS, b, Dodecyl sulfat ionen modelleret med [HyperChem], hvor de negative ladningsfelter fra sulfatgruppens ses i lilla og den lille positive ladning på carbonkæden ses i grøn.

Surfactanter som SDS har desuden en høj grad af strukturel lighed med fedtsyrer [Figur 2.3], som er kendte ligander til både BSA og den humane version af proteinet HSA.



Figur 2.3: a, Fedtsyren dodecansyre, b, Dodecanoat ionen modelleret med HyperChem, hvor de negative ladningsfelter fra sulfatgruppens ses i lilla og den lille positive ladning på carbonkæden ses i grøn. Der er en høj grad af lighed mellem fedtsyrer og de undersøgte surfactanter

Surfactanternes opbygning giver også den interessante egenskab, at de kan danne miceller ved tilpas høje koncentrationer i vandig opløsning. Den koncentration af surfactant (S) der er nok til, at der dannes miceller kaldes critical micelle concentration (CMC). Under antagelse af at miceller er rent stof vil CMC være ligevægtskonstanten  $K_1$  i følgende ligning.



I opløsning med protein vil surfactanter desuden kunne være bundet til protein.

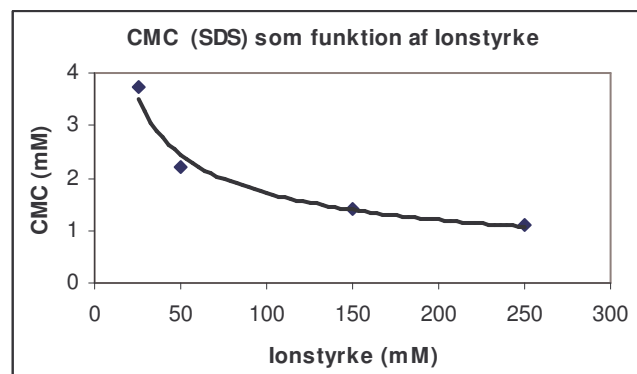


Under antagelse af at bindingen til proteinet er mere favorabel end micelledannelse, kan koncentrationen af monomer findes:

$$[S]_{\text{Total}} - [S]_{\text{Protein}} = [S]_{\text{Monomer}} \quad [2.3]$$

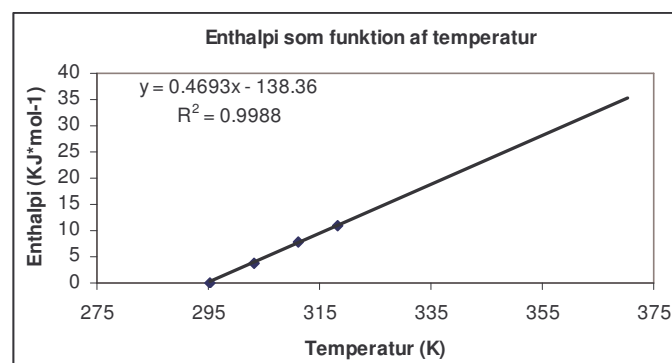
Hvis  $S_{\text{monomer}}$  overstiger CMC, vil der dannes miceller i opløsningen, hvilket vil gøre, at  $S_{\text{monomer}}$  ikke stiger mere. Dette betyder desuden, at de i rapporten udførte eksperimenter ikke kan udføres ved højere monomerkoncentration end CMC.

CMC er afhængig af både ionstyrken i opløsningen og temperaturen. CMC falder ved stigning i ionstyrke, da en højere ionstyrke medfører, at det for den hydrofobe del af surfactanten i højere grad vil være energimæssigt favorabelt at befinde sig i miceller. Desuden vil det være lettere at samle de negative ladninger i SDS i micellerne, da skærmningen af ladningerne er større ved høj ionstyrke. [Figur 2.4].



Figur 2.4: CMC som funktion af ionstyrke ved temperaturen 22°C [Westh upublicerede data].

CMC som funktion af temperaturen er målt i intervallet 22°C til 45°C [Nielsen 2005]. Da denne rapport fremlægger målinger mellem 20°C og 110°C, er det nødvendigt at ekstrapolere disse data. Dette beregnes via enthalpien for micelledannelsen, da det viser sig, at den stiger lineært med temperaturen. Dette betyder, at varmekapaciteten for micelledannelsen er konstant. Ud fra datapunkter estimeres af udviklingen i enthalpien fra 45°C til 100°C [Figur 2.5] [Nielsen 2005].



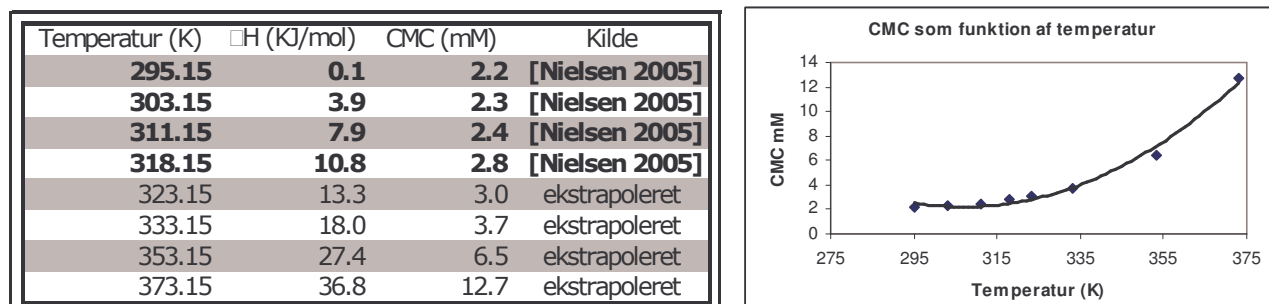
Figur 2.5: Enthalpien for dannelse af miceller mellem 22°C og 100°C. [Nielsen 2005]

Herefter benyttes van't Hoff ligningen til at finde CMC, der, som beskrevet ovenfor, er ligevægtskonstanten mellem surfactant som monomer og surfactant i micelle.



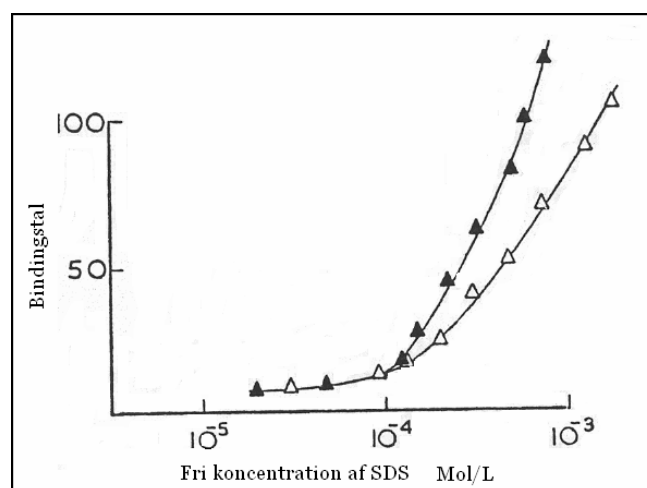
$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{-\Delta H}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \Leftrightarrow K_2 = e^{\left(\frac{-\Delta H}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right)\right)} * K_1 \quad [2.4]$$

De ekstrapolerede data op til 100 °C beregnes [Figur 2.6] [Nielsen 2005].



Figur 2.6: CMC som funktion af temperatur. Baseret på data fra [Nielsen 2005]

CMC stiger eksponentielt over det temperaturinterval forsøget udføres over. Det kan betyde, at CMC overskrides ved lav temperatur, og at CMC overstiger koncentrationen af frie SDS molekyler ved høj temperatur. I beregningen af om CMC er overskredet tages der højde for bindingsisothermen for bindingen mellem SDS og BSA, da BSA vil have bundet op til 200 SDS molekyler pr. proteinmolekyle ved høje monomere koncentrationer af SDS [Rendall 1976]. Bindingstallet [Figur 2.7] stiger ved højere koncentration af frit SDS i opløsningen. Ligeledes er bindingstallet afhængig af ionstyrken af opløsningen; ved høj ionstyrke er bindingen mellem protein og SDS mindre favorabel, sikkert på grund af skærmningen af ladningen i sulfatgruppen.



Figur 2.7: Bindingstal for SDS-BSA ved forskellige koncentrationer af frit SDS. [▲] Er målt ved 10mM NaCl. [Δ] Er målt ved 100mM NaCl [Rendall 1976].

Bindingen er også afhængig af temperatur, men med to modsatrettede effekter, da høj temperatur udfolder proteinet og skaber flere bindingssteder, mens høj temperatur også gør selve bindingen mere ufordelagtig på grund af entropiske bidrag.

I denne rapport benyttes der ud over SDS også de to andre surfactanter STS og SDeS i den eksperimentelle del [Tabel 2.1], og de sammenlignes med kortere og længere kædede alkyl sulfater.

Tabel 2.1: De tre alkylsulfater SDeS, SDS og STS og deres respektive kædelængder.

Navn	Forkortelse	Kædelængde
Sodium Decyl sulfat	SDeS	C10
Sodium Dodecyl sulfat	SDS	C12
Sodium Tetradecyl sulfat	STS	C14

Forskellen mellem de tre alkyl sulfater er kun to carbon på den hydrofobe kæde, men tidligere ITC-data viser, at der er en betydelig forskel i påvirkningen af BSA, ligesom forskel i CMC for de tre surfactanter [Appendiks A]. For denatureringseffekt på BSA tyder det på, at rækkefølgen er STS > SDS > SDeS. For CMC vil der være den modsatte rækkefølge SDeS > SDS > STS. Begge effekter kan relateres til, at jo længere den hydrofobe kæde er, jo mere ufavorabel er dens vekselvirkninger med vand. Dette gør, at længere kædede alkyl sulfater binder bedre til BSA og derved denaturerer det, men at de ligeledes meget lettere samles i miceller.

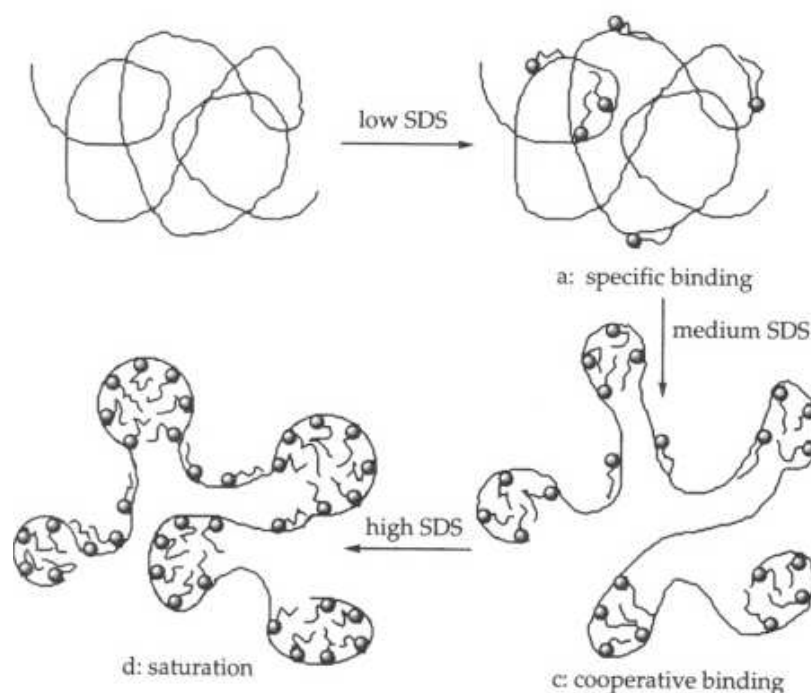
### **2.3 Surfactanters interaktioner med BSA**

Surfactanter binder direkte til proteiner, hvilket kan ændre proteinkonformationen radikalt via forskellige fysisk-kemiske mekanismer; Surfactanter med ladede hovedgrupper kan via elektrostatiske interaktioner binde modsat ladede grupper på proteinoverfladen, mens surfactanters lange upolære kæde binder gennem hydrofobe interaktioner til upolære flader på proteinet [Ananthapadmanabhan 1993]. Alt efter surfactantkoncentration og type af interaktion binder surfactanterne til proteiner enten som monomere eller micellelignende grupper [Ananthapadmanabhan 1993]. Surfactanter kan ligeledes afhængigt af surfactantkoncentration, surfactanttype og omgivelser stabilisere, destabilisere og/eller fremme eller hæmme aggregering. [Ananthapadmanabhan 1993]. Når et protein ændrer konformation, som følge af surfactantbinding, vil dets evne til at binde andre molekyler, selvassociere og absorberes til overflader ændres, herunder dets karakteristiske funktion [Ananthapadmanabhan 1993].

Der findes i litteraturen flest data på BSA's interaktion med SDS, det er derfor mest relevant at give et billede ud fra denne og så vidt muligt generalisere til SDeS og STS.

BSA har en række specifikke og uspecifikke bindingssites, hvortil proteinet kan binde op mod 200 SDS molekyler [Rendall 1976]. De specifikke bindingssites inddeles i højaffinitetssites og lavaffinitetssites, hvor BSA indeholder tre højaffinitetssites og seks lavaffinitetssites for SDS [Nielsen 2000]. Sammenlignes nonioniske og anioniske dodecylkæder ses det, at hydrofobe interaktioner er dominerende i dodecylkædens binding til BSA, mens elektrostatiske interaktioner er med til at styrke denne binding [Nielsen 2000]. Resultater tyder på, at de tre fundne højaffinitetssites er karakteriseret ved både hydrofobe og elektrostatiske interaktioner, mens de seks fundne lavaffinitetssites kun er karakteriseret ved hydrofobe interaktioner [Nielsen 2000].

Der er beskrevet en model for SDSs binding til BSA, kaldet "Necklace and Bead" [Figur 2.8], [Turro 1995]. Ifølge denne model vil BSA foldes omkring 2-4 micellelignende klynger [Vasilescu 1999], når den frie koncentration af SDS når CMC. Disse micellelignende klynger består dog af færre SDS molekyler end frie SDS miceller [Vasilescu 1999]. Ved høje molforhold er SDS bindingen til BSA mindre favorabel, hvilket kan forklares med, at BSA er fuldt mættet med SDS svarende til "necklace and bead" modellen. [Kelley 2003].



**Figur 2.8: Proteinudfoldning af SDS, hvor figur d viser det surfactantmættede protein i den såkaldte "necklace and bead"-model. [Turro 1995]**

For SDeS og STS, som er henholdsvis kortere og længere end SDS, formodes det at de binder på lignende måder, ligesom BSA og fedtsyrer i afsnit 2.1. Ligeledes ses, som beskrevet i afsnit 2.2, at både SDeS og STS danner miceller ved deres respektive CMC, og de derfor kan forventes at binde til BSA, som beskrevet i "necklace and bead" modellen, ved høje monomere koncentrationer. Denne billedlige forståelse af surfactanters bindinger til BSA må dog understøttes af en termodynamisk beskrivelse for at være interessant for denne rapport's formål.

## **2.4 Effekt af ligandbinding på proteinfoldningens termodynamik.**

I følgende afsnit vil den generelle teori for liganders binding til protein samt effekten af denne, blive beskrevet. Ligander forstås her som stoffer, der kan binde til proteiner, hvor surfactanter i denne sammenhæng er en undergruppe af ligander, og teorien er derfor gældende for begge disse.

Affiniteten mellem et protein og en ligand måles ved associationskonstanten  $K_a$  for bindingen ved ligevægt:



$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad [2.6]$$

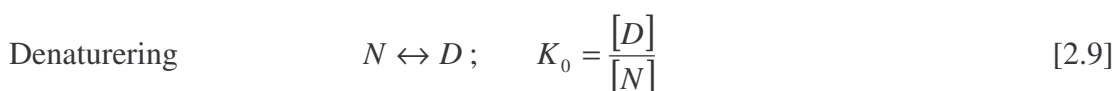
Jo større værdi  $K_a$  har, jo større affinitet. Det er dog nemmere at vurdere dissociationskonstanten,  $K_d$ , der er det reciprokke af  $K_a$ . Når den frie ligandkoncentration er under  $K_d$  bindes meget lidt ligand til proteinet, mens ved en koncentration lig med  $K_d$  vil halvdelen af proteinmolekylerne have bundet ligand [Creighton 1993].

Netto-affiniteten for bindingen under standardbetingelser kan udtrykkes ved Gibbs fri energi for binding  $\Delta G^{\circ}_{bind}$ :

$$\Delta G^{\circ}_{bind} = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \quad [2.7]$$

Ligandbinding fører i mange tilfælde til en stabilisering af proteinet, hvilket i de fleste tilfælde skyldes, at liganden bindes stærkere til det native (N) protein end til det denaturerede (D). Denaturering vil her blive mindre og mindre favorabel i takt med at koncentrationen af ligand stiger [Creighton 1993].

Dette kan illustreres i tilfælde, hvor liganden kun binder specifikt til det native protein. [Fukada 1983 og Sturtevant 1987]



hvor  $K_{L,N}$  er dissociationskonstant for ligandbindingen til det native protein og  $K_0$  er denaturerings ligevægtskonstanten for proteinet uden ligand.

Ved tilstedeværelse af ligand er den effektive denatureringsligevægtskonstant ( $K_{den}$ ) lig med forholdet mellem total koncentrationen af de denaturerede og native proteiner:

$$K_{den} = \frac{[D]}{([N] + [NL])} = \frac{K_0}{\left(1 + \frac{[L]}{K_{L,N}}\right)} \approx \frac{K_0 K_{L,N}}{[L]} \quad [2.10]$$

hvor den approksimerede form gælder ved høje frie ligandkoncentrationer ( $[L] > K_{L,N}$ ). Når koncentrationen af ligand stiger falder  $K_{den}$ , og det bliver mindre sandsynligt, at proteinet denaturerer, som tidligere beskrevet.

Dette kan udtrykkes ved fri energi:

$$\Delta G^{\circ}_{den} = -RT \ln(K_{den}) = \Delta G_{den,0} + RT \ln(1 + [L]/K_{L,N}) \quad [2.11]$$

For høje koncentrationer af ligand gælder at:

$$\Delta G^{\circ}_{den} = \Delta G_{den,0} + \Delta G^{\circ}_{diss,N} + RT \ln(L) \quad [2.12]$$

hvor  $\Delta G_{den,0}$  er Gibbs fri energi for denaturering af proteinet uden ligand og  $\Delta G^{\circ}_{diss,N} = RT \ln(K_{L,N})$  er standard Gibbs fri energi for dissociation af liganden fra dets bindingssite på det native protein. Den stabiliserende effekt skyldes altså den ekstra energi, som det kræver, at få liganden til at dissociere før denaturering, samt bidraget fra entropien for blandingen af den frigjorte ligand med solventet ( $RT \ln(L)$ ).

Ved høje ligandkoncentrationer kan den frie energi inddeles i enthalpi og entropi:

$$\Delta H_{den} \approx \Delta H_{den,0} + \Delta H_{diss,N}^{\circ} \quad [2.13]$$

$$\Delta S_{den} \approx \Delta S_{den,0} + \Delta S_{diss,N}^{\circ} - RT \ln[L] \quad [2.14]$$

Enthalpien stiger altså i tilfælde, hvor liganden stabiliserer proteinet på betingelse af, at det er en eksoterm binding.

Ligander, der interagerer mere favorabelt med specielt ikke-polære proteinoverflader, end med solventet, destabiliserer for det meste proteiner, hvilket skyldes, at et denatureret protein har en større overflade eksponeret til solventet end et nativt.

Interaktionen mellem det denaturerede protein og liganden kan beskrives på følgende måde, dog kun gældende når liganden udelukkende binder sig til det denaturerede protein:

$$D + L \leftrightarrow DL ; \quad K_{L,D} = \frac{[D] \cdot [L]}{[DL]} \quad [2.15]$$

Hvorved ligevægtskonstanten for denatureringen i dette tilfælde bliver:

$$K_{den} = \frac{([D] + [DL])}{[N]} = K_0 \left( 1 + \frac{[L]}{K_{L,D}} \right) \approx K_0 \cdot \frac{[L]}{K_{L,D}} \quad [2.16]$$

den Gibbs frie energi bliver:

$$\Delta G_{den} = -RT \ln(K_{den}) = \Delta G_{den} - RT \ln \left( 1 + \frac{[L]}{K_{L,D}} \right) \quad [2.17]$$

$$\Delta G_{den} \approx \Delta G_{den,0} - \Delta G_{diss,D}^{\circ} - RT \ln[L] \quad [2.18]$$

(for høje koncentrationer af ligand)

Her ses et fald i den frie energi for denatureringen, hvorved den bliver mere favorabel. Som i tilfældet, hvor liganden kun bindes til det native protein, kan der ligeledes udledes udtryk for enthalpien og entropien:

$$\Delta H_{den} = \Delta H_{den,0} - \Delta H_{diss,D}^{\circ} \quad [2.19]$$

$$\Delta S_{den} \approx \Delta S_{den,0} - \Delta S_{diss,0}^{\circ} + RT \ln[L] \quad [2.20]$$

Ligandbindingen vil altså i dette tilfælde medføre et fald i enthalpien [Cooper 1999].

Effekten af ligandbinding, til enten det native eller det denaturerede protein, på  $T_m$  kan beskrives ved følgende simple model, der antager  $n$  antal identiske og uafhængige bindingssites på proteinet:

$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \pm \left( \frac{nRT_{m,0}}{\Delta H_{Den,0}} \right) \ln \left( 1 + \frac{[L]}{K_L} \right) \quad [2.21]$$

hvor  $K_L$  er bindingskonstanten pr. site,  $R$  er gaskonstanten,  $\Delta H_{\text{den},0}$  er enthalpien for denatureringen ved transitionstemperaturen,  $T_{m,0}$ , ved fravær af ligand, og  $\Delta T_m = T_m - T_{m,0}$  er ændringen i denatureringstransitions temperatur.  $\pm$  tegnet relaterer til om liganden stabiliserer den native (+) eller denaturerede form (-).

Selv ved ligandkoncentrationer, hvor proteinet er fuldt ligandbundet, fortsætter  $T_m$  ændringen ved stigning i ligandkoncentration. Dog findes der tilfælde hvor  $T_m$  ændringen flader ud ved høje ligandkoncentrationer, hvilket som regel betyder at liganden binder sig til både det native og denaturerede protein, men med forskellige affiniteter [Cooper 1999 og Cooper 1993].

### **3. Metode og materialer**

Temperaturafhængigheden for proteindenaturering er meget vigtig i en termodynamisk sammenhæng.

Den metode, der er anvendt til frembringelse af data, brugt i denne rapport, er Differential Scanning Calometry (DSC). Ved DSC måles varmekapaciteten ved konstant tryk ( $C_p$ ) af en opløsning som en funktion af temperaturen ( $T$ ). Under opvarmning ændres det native proteins  $C_p$  kun lidt, men ved denaturering ses et stort peak, hvilket er ofrårsaget af et stort varmeoptag – en transition. Når denatureringen er fuldstændt, bliver proteiners  $C_p$  næsten konstant og højere end før transitionen. Dette skyldes, at  $C_p$  til en vis grad bestemmes af den ikke-polære overflade, der eksponeres til solventet, hvor den høje værdi skyldes vandets ordening omkring overfladen, hvilken er større for denaturerede end native proteiner [Creighton 1993].

Cellerne indeholdende prøve og reference tilføres elektrisk energi ved konstant rate, men da opløsningerne er forskellige, kræves der forskellige mængder energi til at hæve temperaturen i cellerne. Denne forskel i tilført varme ( $q_{p,ex}$ ), kan benyttes til at udregne en række praktiske termodynamiske parametre for det undersøgte system. Heriblandt  $\Delta H$  for den temperatur-inducerede denaturering af proteinet. Når der ikke forekommer transition er der en lineær sammenhæng mellem den tilførte varme og temperaturen af prøven, hvis  $C_p$  er konstant i intervallet:

$$q_p = C_p \Delta T \quad [3.1]$$

Ved transitionen må der tilføres ekstra varme til referencecellen for at opnå samme ændring i temperatur i prøve og referencecelle:

$$q_p + q_{p,ex} \quad [3.2]$$

På samme måde skriver vi varmekapaciteten af prøven:

$$C_p + C_{p,ex} \quad [3.3]$$

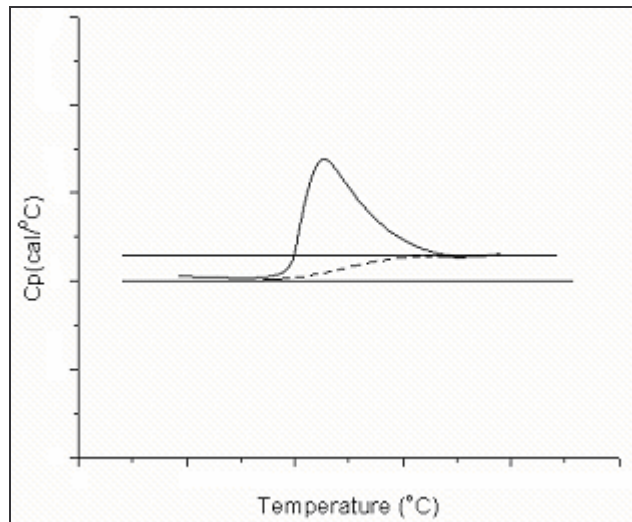
Disse udtryk kombineres i:

$$q_p + q_{p,ex} = (C_p + C_{p,ex})\Delta T \quad [3.4]$$

som omskrives til:

$$\frac{q_p + q_{p,ex} - \Delta T C_p}{\Delta T} = C_{p,ex} = \frac{q_{p,ex}}{\Delta T} \quad \text{da } q_p = C_p \Delta T \quad [3.5]$$

Plottes  $C_p$  som funktion af  $T$  fås et såkaldt termogram, som det vist i [Figur 3.1] Da  $C_p$  for det denaturerede protein er højere end for det native, ligger basislinien efter transitionen over den før. Derfor ekstrapoleres en ny basislinie mellem de to basislinier.



Figur 3.1: Termogram med to basislinier, for nativt og denatureret protein. Den stiplede linie er den ekstrapolerede basislinie.

Definitionen af  $C_p$  er:

$$C_p = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad [3.6]$$

Det medfører:  $dH = C_p dT$ , derved bliver enthalpiændringen integralet mellem basislinien og funktionen, fra en temperatur før transitionen ( $T_1$ ) og en efter ( $T_2$ ):

$$\Delta H_{den} = \int_{T_1}^{T_2} C_{p,ex} dT \quad [3.7]$$

Da vi i dette studie arbejder med kendte koncentrationer, benytter vi den molære varmekapacitet ved konstant tryk  $\langle C_p \rangle$ , altså:

$$\Delta H_{den} = \int_{T_1}^{T_2} \langle C_{p,ex} \rangle dT \quad [3.8]$$

Ligeledes for udregning af entropi for transitionen:

$$\Delta S_{den} = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\langle C_p \rangle}{T} dT. \quad [3.9]$$

I realiteten udregnes alt dette automatisk via specialiserede programmer og vil blive gennemgået senere i afsnittet. Det punkt i termogrammet, hvor toppens areal kan deles lige, kaldes proteinets transitions midtpunkt  $T_m$ , der er det punkt, hvor halvdelen af proteinerne er denaturerede, hvilket i simple tilfælde er den temperatur, hvor standard Gibbs frie energi for denaturering er lig nul [Cooper 1999]. Yderligere findes det temperatur interval, som transitionen strækker sig over og arealet under grafen for denne, hvor arealet under grafen, som beskrevet, er det samme som enthalpien for denatureringstransitionen.



### **3.1 Materialer**

Til forsøgene bruges BSA fra Sigma-Aldrich i 99% renhed (Essentially fatty acid free, essentially globulin free) hvilket betyder, at der ikke er rester af fedtsyre ligander og andre proteiner. Der laves stamopløsninger af BSA for at opnå koncentrationen 60 $\mu$ M i forsøget. Protein koncentrationen i stamopløsningen bestemmes med UV-spektroskopi, ved bølgelængden ( $\lambda$ ) på 278nm og brug af en ekstinktionskoefficient ( $\epsilon$ ) på 44 300 M cm<sup>-1</sup>. Ved målingen blev blandingen fortyndet ti gange. Stamopløsningen laves med en buffer indholdene 50mM Tris og 2mM EDTA, indstillet med HCL til pH 7,0.

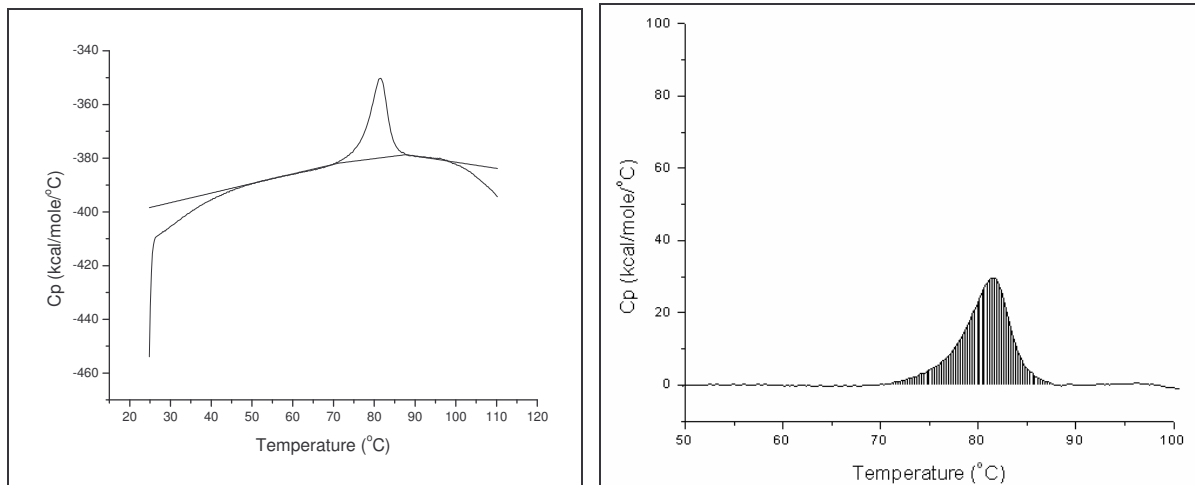
De tre surfactanter, der benyttes i forsøgene, er henholdsvis SDeS i 99% renhed fra Fluka Chemika, SDS fra Fluka Chemika i 99% renhed og STS i 95% renhed fra Sigma-Aldrich. Surfactant stamopløsning fremstilles med en buffer med 50mM Tris og 2mM EDTA, indstillet med HCL til pH 7,0. Inden DSC måling blandes surfactant stamopløsning og buffer ved stuetemperatur, hvorefter BSA stamopløsning tilsættes, alt sammen i forhold, der giver de ønskede koncentrationer i et samlet volumen på 2 mL. Det viste sig nødvendigt at opvarme stamopløsningen af STS til 50°C for at have en homogen opløsning, da den ved stuetemperatur er en uklar opslemning.

### **3.2 Forsøgets udførelse**

Der udføres to serier af DSC på en opløsning af BSA, med forskellige molforhold af surfactanter SDS, SDeS og STS samt uden surfactanter. Molforholdet surfactant/BSA for de tre serier udvælges på baggrund af Isothermal Titration Calorimetry (ITC) målinger [Appendiks A] og er udvalgt til således at dække et bredt spektrum af molforhold omkring BSAs surfactant inducerede denaturering. Til DSC målinger benyttes et MicroCal<sup>®</sup> kalorimeter med én prøvecelle og én referencecelle, cellevolumen på 1,32ml, individuel varmetilførsel og tilsluttet PC med MicroCal<sup>®</sup> dataopsamlingsprogram. Der tilføres et tryk på 2,5 bar før, der scannes i intervallet 20 til 110°C, og scanningsraten sættes til 1°C/min, der skønnes ikke at være fordele ved at køre langsommere end dette [Pico 1997].

### **3.3 Databehandling**

Alle data analyseret i Origin<sup>®</sup> version 7.0 med DSC modul. Dataene, der kommer ud af MicroCal<sup>®</sup> dataopsamlingsprogrammet, er en temperatur angivet i °C og en varmekapacitetsforskel angivet i mCal/°C. Dataene tilrettes i Origin<sup>®</sup> efter BSA-koncentrationen og prøvecellevolumen, så data fremstår i kCal °C<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. På grafen for data indsættes en basisline efter bedste skøn [Figur 3.2a], så arealet under toppen, som svarer til transitionsenthalpien [Figur 3.2b], og transitionsmidtpunktet T<sub>m</sub> kan findes.



**Figur 3.2: a) Indtegning af basislinie og b) bestemmelse af integralet under grafen, hvor basislinien er fratrukket.**

Transitionsenthalpien og smeltepunktets afhængighed af molforholdet mellem surfactant og BSA bruges videre i rapporten. Herudover vil databehandlingen foregå i resultatafsnittet.

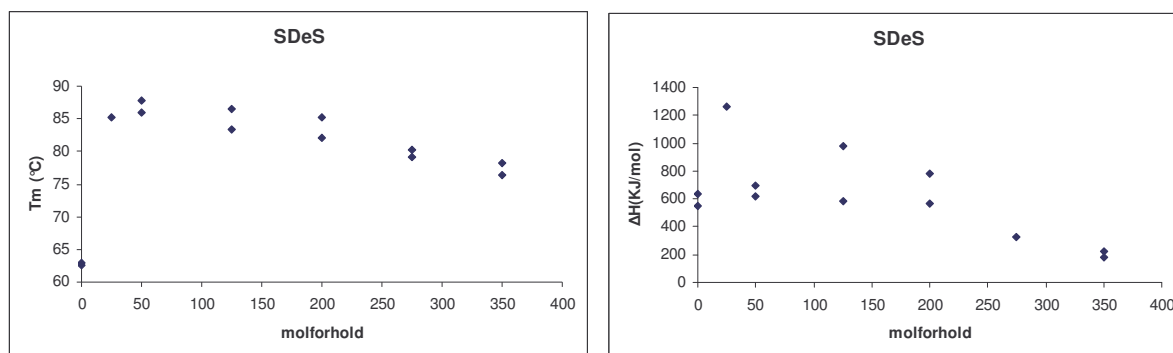
## 4. Resultater

### 4.1 DSC profil af BSA ved tilstedeværelse af SDeS

Der blev undersøgt SDeS:BSA molforhold i intervallet 0 – 725. Denatureringen af BSA er afhængig af mængden af SDeS bundet og denne bliver mere favorabel ved stigende SDeS:BSA molforhold. Dette ses som et fald i  $T_m$  og  $\Delta H_{cal}$  [Figur 4.1]. De forskellige værdier for  $T_m$  og  $\Delta H_{cal}$  er opstillet i tabel 4.1.

**Tabel 4.1: Termodynamiske parametre fra DSC målinger af BSA ved tilstedeværelse af SDeS ved pH 7.0.** Der blev foretaget dobbeltbestemmelser og begge resultater er vist i tabellen. De manglende værdier skyldes fejl i målingerne.

SDeS:BSA Molforhold	$T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ kJ/mol	$\Delta H_{cal}$ KJ/mol
0	62.6	62.9	639.7	551,7
25	85.2	-	1260	-
50	87.8	85.9	763.1	617.1
125	86.4	83.4	980.1	582.5
200	82.1	85.2	570.5	779.6
275	80.3	79.2	325.9	-
350	76.4	78.3	177.6	219.9



**Figur 4.1. a:  $T_m$  som funktion af molforholdet SDeS:BSA. b:  $\Delta H_{cal}$  funktion af molforholdet SDeS:BSA. Begge figurer viser først en stigning i området fra molforhold 0 - 50 og derefter et fald i området > 50.**

Ud fra  $T_m$ -værdierne opdeles resultaterne i to dele:

#### SDeS:BSA ved lave molforhold (0-50):

$T_m$ -værdierne stiger fra nul til 50, hvor den højeste værdi findes. Denne værdi er gennemsnitlig 24 °C højere end  $T_m$  for defatted BSA uden surfactant bundet. Den højeste  $\Delta H_{cal}$  værdi findes ved molforhold 25 til 1260 kJ/mol, hvilket næsten er en fordobling af  $\Delta H_{cal}$  i forhold til defatted BSA uden bundet surfactant.

#### SDeS ved høje molforhold (125-725):

Efter molforhold 50 falder  $T_m$  støt frem til 350. Ved høje molforhold (fra 425 -) ses ingen top, hvilket indikerer, at alt BSA i prøven er denatureret ved dette molforhold, eller at enthalpien for transitionen bliver nul [figur 5.1]. Resultatet viser, at der stadig findes stabilt protein i molforhold så høje som 350. Dette er også forventet, da tidligere undersøgelser har vist, at SDeS i molforhold op til 40 stabiliserer BSA for herefter at destabilisere proteinet [Yamasaki 1996].

## 4.2 DSC profil af BSA ved tilstedeværelse af SDS

SDS:BSA systemet blev undersøgt i molforholdene 0 – 190. Ud fra  $T_m$  værdierne er resultaterne opdelt i to dele:

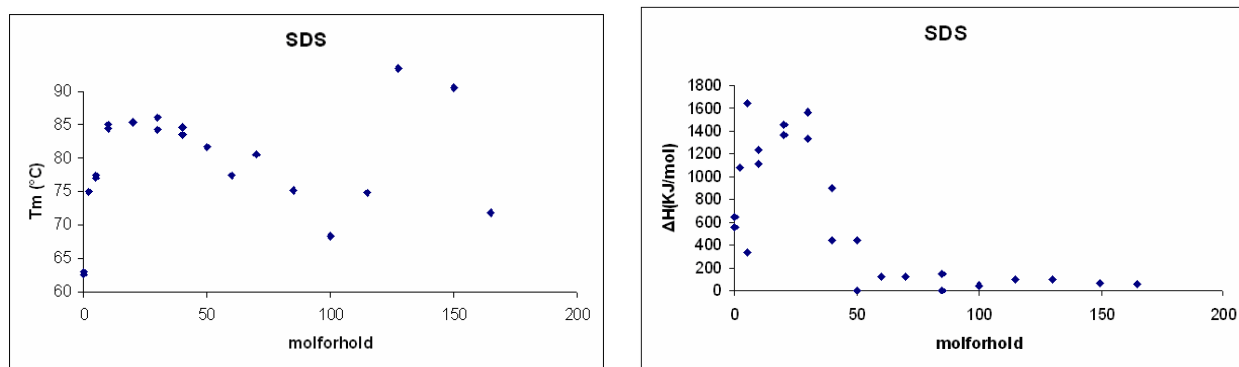
### **SDS:BSA ved lave molforhold (0 – 20):**

Ved molforhold fra 0 til 20 ses en forskydning mod højere værdier både for  $T_m$  og  $\Delta H_{cal}$  [Tabel 4.2]. Den højeste  $T_m$  værdi observeres ved et molforhold på 30 for måling 2, hvor  $T_m$  er 86,1 °C. Usikkerheden på resultaterne er dog stor og det kan derfor ikke siges med sikkerhed, om det er ved molforhold 20 eller 30, hvor  $T_{m, max}$  findes. For  $\Delta H_{cal}$  ses den højeste værdi ved molforhold 5, men igen er der også stor usikkerhed på disse data. Resultaterne viser, at SDS stabiliserer BSA helt op til molforhold omkring 20 – 30.

Ved SDS:BSA molforhold på to, fem og ti ses en opsplitning af signalet i to forskellige  $T_m$ -værdier. Opsplitningen er mest udtalt ved molforhold to og mindst ved ti, hvor opsplitningen ses som en skulder [Appendix C]. De mindste  $T_m$ -værdier for bifaserne er dem vist i [Tabel 4.2].

**Tabel 4.2: Termodynamiske parametre fra DSC målinger af BSA ved tilstedeværelse af SDS ved pH 7.0. Der blev foretaget dobbeltbestemmelser og begge resultater er vist i tabellen. De manglende værdier skyldes fejl i målingerne.**

SDS:BSA molforhold	$T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ kJ/mol	$\Delta H_{cal}$ kJ/mol
0	62.6	62.9	639.7	551,7
2	75.0	-	1079	-
5	77.5	77.0	327.8	1649
10	85.0	84.4	1111	1230
20	85.3	85.3	1453	1372
30	84.3	86.1	1335	1562
40	84.6	83.6	897.7	442.0
50	-	81.7	-	450.0
60	77.4	-	120.0	-
70	80.6	-	122.2	-
85	-	75.2	-	140.0
100	68.3	-	45.01	-
115	74.8	-	98.62	-
130	-	94,8	-	34,08
150	-	91,7	-	13,93
165	-	71.9	-	59.69
190	-	-	-	-



Figur 4.2: a:  $T_m$  afhængigheden af SDS:BSA forholdet. b: enthalpiens afhængighed af dette forhold. Begge kurver viser en stigning ved lave molforhold og fald ved højere molforhold

#### SDS:BSA ved høje molforhold (30 – 190):

Ved stigning i SDS koncentration ses en udvikling mod lavere  $T_m$  og  $\Delta H_{cal}$  værdier. Dette viser, at SDS ved disse koncentrationer denaturerer BSA til et stabilt stadie, og at denne effekt er afhængig af koncentrationen af SDS, således at jo højere koncentration jo større denaturerende effekt. Disse resultater stemmer overens med tidligere undersøgelser [Kelley 2003], der også viser fald i  $\Delta H_{cal}$  ved samme molforhold.

Ved molforhold over 60 bliver  $T_m$  ustabil, hvilket skyldes, at udslagene var meget små [Appendiks C], og at det derfor var svært at bestemme toppunktet. Der er stort set heller ingen transitionsenthalpi i dette område, og det vurderes, at proteinet er denaturet. Det bemærkes at der ved molforhold over 100 fremkommer nogle markant høje værdier af  $T_m$ , hvilket ikke stemmer overens med almindelig denaturering.

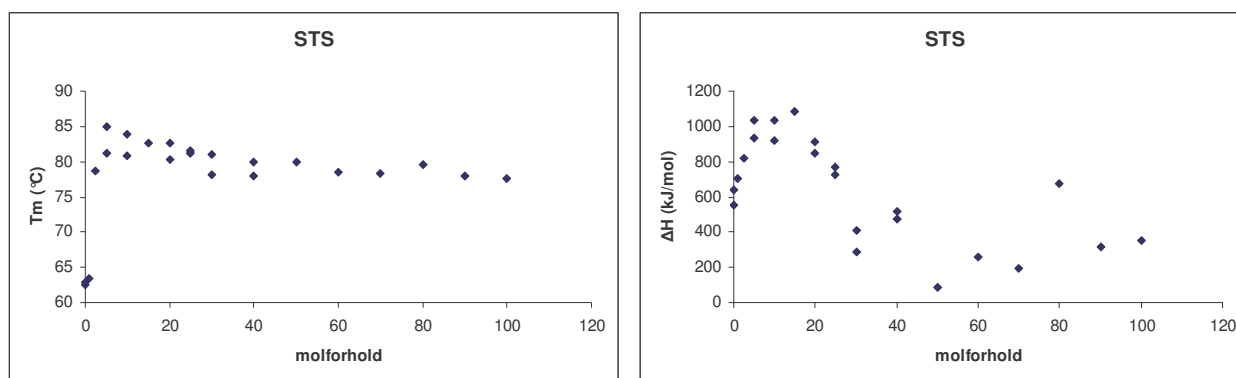
Koncentrationsafhængigheden af henholdsvis  $T_m$  og  $\Delta H_{cal}$  er vist i figur 4.2, og de termodynamiske parametre er opstillet i tabel 4.2.

### 4.3 DSC profil af BSA ved tilstedeværelse af STS

Molforholdene i intervallet 1-100 af STS-BSA systemet blev undersøgt for  $T_m$ , samt enthalpien for den temperaturinducerede transition [Tabel 4.3]. Udviklingen i disse parametre er vist i figur 5.3 og viser en samlet tendens til fald ved højere molforhold i overensstemmelse med denne rapport's andre undersøgelser. Til forskel fra SDeS og SDS findes der ikke i forvejen fyldestgørende studier af de lave surfactant:BSA molforhold for STS, derfor blev der undersøgt så lave STS:BSA molforhold som 1; 2,5 og 5.

**Tabel 4.3: Termodynamiske parametre fra DSC målinger af BSA ved tilstedeværelse af STS ved pH 7.0. Der blev foretaget dobbeltbestemmelser og begge resultater er vist i tabellen. De manglende værdier skyldes fejl i målingerne.**

STS:BSA molforhold	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>cal</sub> (KJ/mol)	ΔH <sub>cal</sub> (KJ/mol)
0	62.6	62.9	639.7	551,7
1	63.5	-	704.9	-
2.5	78.7	-	819.0	-
5	84.9	81.3	1034	936.1
10	83.9	80.8	1031	923.1
15	82.7		1082	
20	82.7	80.3	915.1	844.6
25	81.2	81.5	722.4	766.2
30	81.0	78.2	285.8	409.8
40	80.0	77.9	471.9	514.8
50	80.0	-	88.6	-
60	78.5	-	259.3	-
70	78.2	-	197.3	-
80	79,5		674.6	
90	78.0		319.6	
100	77.6	-	353.6	-



**Figur 4.3. a: T<sub>m</sub> som funktion af molforholdet STS:BSA. b: ΔH<sub>cal</sub> som funktion af molforholdet af STS:BSA. Begge figurer viser først en stigning og herefter et fald i de termodynamiske parametre, hvilket viser, at STS i molforhold 0– 5 stabiliserer BSA og ved molforhold 10 - 100 denaturerer BSA.**

Ligesom for SDeS og SDS kan resultaterne opdeles i to grupper:

#### **STS:BSA ved lave molforhold (0 – 15):**

Ved disse molforhold ses en stor stigning i T<sub>m</sub> ved de laveste molforhold, hvor den stiger fra 62,6 °C for rent BSA til 79,7 °C for STS:BSA i molforholdet 1. Denne stigning fortsætter til molforholdet 5, hvor der observeres en T<sub>m, max</sub>-værdi på 84,9 °C i den ene måling. Ligeledes ses en stigning i ΔH<sub>cal</sub> værdierne, der når en maksimumværdi ved molforhold 15 med en ΔH<sub>cal</sub> på 1082,6 kJ/mol.

Ved STS:BSA molforhold på 1 ses en tydelig opsplitning af signalet i to adskilte T<sub>m</sub> for transitionen og en mindre for molforhold 2,5 [Appendix E]. Den laveste T<sub>m</sub>-værdi er medtaget i tabel 5.3.

#### **STS:BSA ved høje molforhold (20 – 100):**

Ved molforholdet på ca. 20 ses det på figur 4.3], at både  $T_m$  og  $\Delta H$  her påbegynder et fald, der omkring molforhold  $>30$  stabiliseres og flader ud. Dette indikerer, at STS, som forventet, forstyrrer BSAs native struktur, når der er mange surfaktanter per protein.

#### **4.4 Eksperimentelle usikkerheder**

Der findes flere forskellige faktorer, der kan have indflydelse på resultaterne i dette projekt. En fejlkilde er renheden af målecellen, der hvis den ikke bliver rengjort grundigt nok, stadig vil indeholde rester af surfaktanter og proteiner, der eventuelt kan få indflydelse på og rykke den næste målings transition. Usikkerheder i databehandling ligger f.eks. i beregning af enthalpien i Origin<sup>®</sup>, der kan afhænge af den valgte basislinje.

Ydermere findes der de tilfældige usikkerheder, der altid vil være til stede ved brug af udstyr som DSC apparatet. I forbindelse med blanding af prøver anvendes Finnpietter med en hvis usikkerhed og UV-spektroskopi til bestemmelsen af BSA koncentrationen måler også med afvigelser.

## 5. Diskussion

Ud fra de resultater, der er blevet præsenteret i dette studie, kan flere problemstillinger inden for proteinstabilitet ved påvirkning af surfactanter behandles. Længden af den hydrofobe carbonkæde i surfactanten korreleres til bindingstal ved  $T_{m,max}$  og dens effekt i denaturering. De opnåede data ved lave molforhold viser to tydelige toppe, hvilket tyder på en to trins transition, og derfor diskuteres bifase modeller [Shrake 1988 og Yamasaki 1996]. Desuden opstilles, ud fra resultaterne opnået i dette studie, kombineret med ITC data og data fra andre studier [Deep 2001 og Giancola 1997], fasediagrammer for BSA ved indvirkning af de tre surfactanter SDeS, SDS og STS. Dette er blevet gjort for, at kunne beskrive de konformationer BSA kan findes i ved forskellige temperaturer og surfactantkoncentrationer.

### 5.1 Effekt af surfactant kædelængde på proteinstabilitet

Et af formålene med dette projekt er at bestemme surfactanters carbonkædelængdes betydning for proteinstabilitet.

Det er forventet, at surfactanterne på grund af deres struktur ved lave koncentrationer ville stabilisere BSA og ved højere koncentrationer destabilisere BSA. Dette skyldes, at surfactanterne ved lave koncentrationer vil binde stærkest til det native protein med både elektrostatiske og hydrofobe kræfter og herved stabilisere denne form [Ligning 2.8]. Som koncentrationen stiger, vil de hydrofobe sites på overfladen af proteinet blive mættede, og det vil derfor blive mere favorabelt for surfactant molekylerne at interagere med det denaturede protein, hvor flere hydrofobe sites vil være tilgængelige [Ligning 2.15]. Det vil derfor også forventes, at denaturerende effekter af surfactanten vil forekomme ved lavere molforhold, jo mere hydrofob den bliver.

I nedenstående tabel er  $T_{m,max}$  opstillet for de forskellige surfactanter målt i dette studie, samt værdier fra andre undersøgelser.

**Tabel 5.1: Data for sammenhængen mellem alkylkædelængden og  $T_{m,max}$ .**

Surfactant	Egne data		Fra [Yamasaki 1996]	
	Surfactant:BSA Molforhold	$T_{m,max}$ (°C)	Surfactant:BSA Molforhold	$T_{m,max}$ (°C)
STS	5	83,1	-	-
SDS	20	85,3	12	87,3
SDeS	50	86,8	40	89,9
SOS	-	-	110	90,8
SHS	-	-	260	87,9

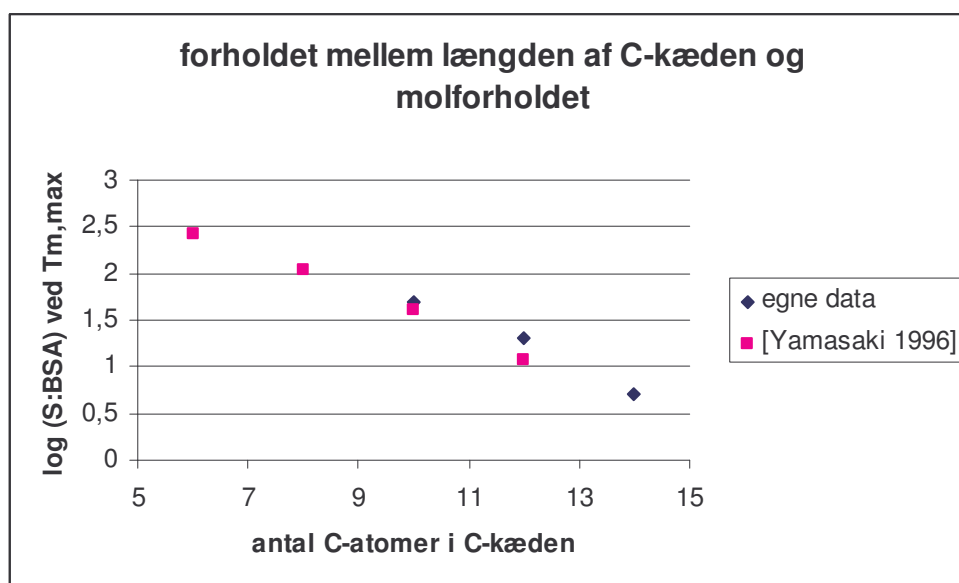
Som det ses af tabel 5.1, er der forskel i  $T_{m,max}$  for forskellige surfactant:BSA systemer. For resultaterne i dette projekt er værdien faldende med stigende kædelængde i rækkefølgen SDeS ( $C_{10}$ ) > SDS ( $C_{12}$ ) > STS ( $C_{14}$ ). Hvis  $T_{m,max}$  værdien tages som et mål for surfactantens evne til at stabilisere BSA, viser resultaterne, at det er SDeS ( $C_{10}$ ) med den korteste kædelængde, der stabiliserer BSA bedst. Ved sammenligning med andres resultater [Yamasaki 1996] findes en lignende sammenhæng fra SDS ( $C_{12}$ ) til SOS ( $C_8$ ) [Tabel 5.1]. Her er yderligere undersøgt SHS ( $C_6$ ), der dog viser sig at have lavere  $T_{m,max}$ -værdi end både SOS ( $C_8$ ) og SDeS ( $C_{10}$ ). Forskellen mellem SHS ( $C_6$ ) og de andre surfactanter ligger i længden af carbonkæden, så afvigelsen må enten skyldes steriske grunde [Yamasaki 1996], eller eventuelt tab af den hydrofobe effekt.



Som forventet ses en tendens til, at  $T_{m,max}$  nås ved lavere molforhold jo længere carbonkæden er [Tabel 5.1], så molforholdene ved  $T_{m,max}$  falder i rækkefølgen SDeS ( $C_{10}$ ) > SDS ( $C_{12}$ ) > STS ( $C_{14}$ ). Dette betyder, at der skal færre STS-molekyler til at destabilisere BSA i forhold til SDS og SDeS, hvilket medfører, at surfactanter med længere carbonkæder er mindre egnede til industriel anvendelse, hvor man ønsker aktive enzymer, samtidig med at man har store mængder surfactanter tilstede.

Den samme tendens er fundet i andre undersøgelser [Yamasaki 1996 og Deep 2001], der desuden viser, at tendensen også gælder for surfactanter med kortere carbonkæde end dem, der er målt på i dette projekt [Tabel 5.1]. Forholdet mellem molforhold og længden af carbonkæden er illustreret i [Figur 5.1] og viser en logaritmisk sammenhæng.

Den hurtigere stigning i  $T_m$  for surfactanterne med længere kæde viser, at den hydrofobe effekt er meget vigtig for surfactanters evner som stabiliserende/destabiliserende.



Figur 5.1: Plot af  $\log(\text{surfactant:BSA})$  i forhold til antallet af carbonatomer i surfactantens alkylkæde viser, at det molforhold, hvor  $T_m$  er størst, falder med stigende antal C-atomer.

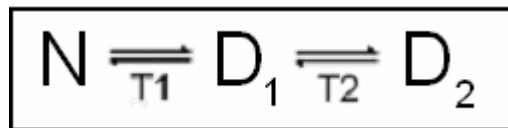
Som tidligere nævnt binder Sudlows site I kun mellemlange fedtsyrer, mens Sudlows site II både binder mellemlange og lange fedtsyrer, hvilket kan forklares med, at den hydrofobe kløft i Sudlows site I er mindre end site II [Bhattacharya 2000]. Under antagelse af lighed mellem anioniske surfactanter og fedtsyrer, underbygges hypotesen om, at flere kortere surfactantmolekyler kan bindes i de hydrofobe kløfter i forhold til længerekædede surfactanter.

Der er i dette studie ikke undersøgt surfactanter med længere carbonkæde end 14, så det er svært at vurdere om faldet i  $T_{m,max}$  forsætter med stigende kædelængde. Opløseligheden af surfactanterne falder desuden markant ved længere carbonkæder.

## 5.2 Bifase denaturerings modeller

Ved lave molforhold af de benyttede surfactanter observeres to adskilte  $T_m$  for transitionen, hvilket tidligere er observeret for SDS-BSA ved lave molforhold [Deep 2001, Giancola 1997 og Yamasaki 1992], samt for SDeS og SOS [Yamasaki 1996]. Normalt forventes kun en enkelt endotherm transition ved DSC, men store proteiner, som BSA kan dog have mere komplekse profiler som

resultat af uafhængig smeltning af domæner i molekylet [Ptitsyn 1995]. Denne tankegang har ført til en hypotese for BSAs transition ved lave molforhold, hvor termisk denaturering menes at medføre en deling af BSA i to dele med hvert sit smeltepunkt for transitionen [Yamasaki 1996] [Figur 5.2]. Mere præcist formuleret i den udbyggede statistisk termodynamiske model over denne hypotese af Giancola et al, hvor det antages, at den første endotherm skyldes denatureringen af et domæne af BSA, mens den anden endotherm skyldes denatureringen af den kooperative enhed af de to andre domæner [Giancola 1997].

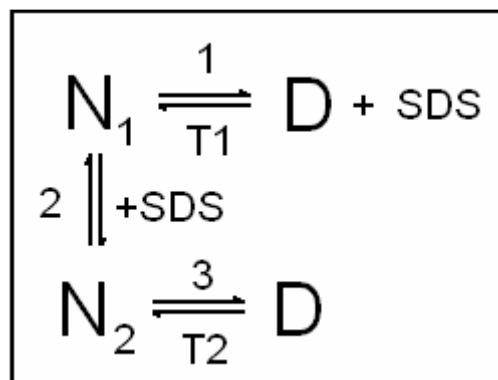


**Figur 5.2: Yamasakis bifasemodel.** Det native protein, enten med eller uden bundet SDS, består af to adskilte domæner med forskellige midtpunkter for transitionen ved temperatur T1 og T2.

Området mellem arginin 184 og arginin 216 indeholder 8 positivt ladede aminosyrer og er overordnet positivt ladet. Den termisk inducerede transition skyldes elektrostatiske repulsive kræfter mellem disse positive ladninger [Yamasaki 1990], mens anioniske surfactanter menes at neutralisere området ved binding mellem sulfatgruppen og de positivt ladede aminosyrer i området, hvilket Yamasaki et al. foreslår som baggrunden for anioniske surfactanters stabiliserende effekt [Yamasaki 1996].

Denne hypotese må naturligvis medføre, at defatted BSA også udviser en tydelig bifase profil og en sådan, mener Yamasaki at se i sine data [Yamasaki 1996], hvilket til dels støttes af [Kelley 2003]. Flere andre undersøgelser finder dog kun en enkelt endotherm ved DSC målinger på BSA uden surfactanter eller fedtsyrer [Giancola 1997, Deep 2001]. Ydermere, som det pointeres af Deep og Ahluwalia, ville den anden endotherm have mindst den dobbelte enthalpi af den første peak, da de to domæner af BSA i denne transition hver for sig er ca. lige så store som den første [Deep 2001].

En anden model udviklet for HSA, foreslået af Shrake og Ross, antager, at de to endothermer observeret ved lave molforhold skyldes den termiske denaturering af først surfactant-fattige og derefter surfactant-rige proteiner [Shrake 1990]. Dette opnås af en forstyrrelse af ligandbindings ligevægten under termisk denaturering, som er forbundet med ligevægten mellem den native og den denaturerede konformation [Shrake 1988]. Det kan antages, at ved et SDS:BSA molforhold på 1 har hvert protein bundet én surfactant og opnået den tilhørende stabilisering af strukturen. Når temperaturen for transitionen nås, denatureres halvdelen af BSA molekylerne og den specifikke strukturafhængige binding brydes. Herved øges koncentrationen af frit SDS, som hurtigt binder til den andel proteiner, der endnu ikke er denatureret og dermed øges disses stabilitet i overensstemmelse med  $T_m$  for et SDS:BSA molforhold på 2 [Figur 5.3].



Figur 5.3: I første trin sker en termisk denaturering af den native konformation bundet til SDS ( $N_1$ ) ved temperaturen  $T_1$ , det denaturerede stadie (D) har mistet sine specifikke bindinger til SDS hvorved  $[\text{SDS}]_{\text{fri}}$  stiger. Proteiner i  $N_1$  har nu yderligere SDS at binde til, hvorved proteinet stabiliseres yderligere i trin 2 til  $N_2$  og derfor først denaturerer ved  $T_2$  i trin 3.

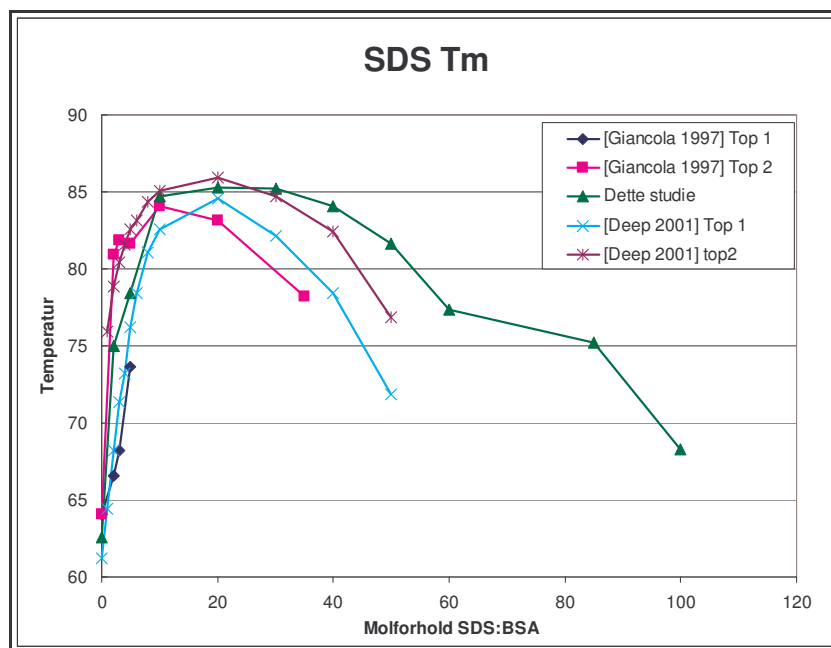
Under denne model skal der således kun fremkomme én endotherm på termogrammet for defatted BSA uden tilstedeværelse af surfactanter, og fremkomsten af flere tyder på rester af surfactant i prøven eller fedtsyrer på proteinet. Som konsekvens af modellen må det formodes, at bifase systemet ikke længere kan eksistere ved og efter  $T_{m,\text{max}}$ . Binding af frie surfactanter, fremkommet som følge af den termiske denaturering af surfactantfattigt BSA, giver ikke længere mulighed for en mere stabil surfactantrig population, da den maximale stabilitet er nået. Så frigivelse af surfactant kan kun føre til konformationer af BSA, der er lige så - eller mindre stabile end de surfactantfattige. Transitionen vil da ske samtidig og give en enkelt endotherm. Modellens forudsigelse er i overensstemmelse med de observerede data for bifaseområdet. Shrake og Ross modellen benyttes, på baggrund af ovenstående, i udfærdigelsen af fasediagrammer for de tre surfactant-BSA systemer til at give et billede af bifase området.

### 5.3 Fasediagrammer

På baggrund af egne DSC data og upublicerede ITC resultater [Appendiks A] udfærdiges fasediagrammer for BSA ved forskellige Surfactant:BSA molforhold og temperaturer. Fasediagrammerne er gældende for BSA koncentrationer på  $60\mu\text{M}$ ,  $50\text{mM}$  TRIS og pH 7,0. Målet er at bidrage til en bredere forståelse af BSAs stabilitet og proteinstabilitet generelt. Viden om proteinstabilitet ved varierende temperaturer og koncentrationer af surfactanter er essentiel i industrien, hvor de er uundgåelige faktorer i de miljøer proteinerne har deres funktion.

### 5.4 Fasediagram ved påvirkning af SDS

Når data opnået gennem dette studie plottes mod eksperimentelle og simulerede resultater fra tidligere studier [Giancola 1997 og Deep 2001], er der en god sammenhæng, når man tager højde for de eksperimentelle usikkerheder [Figur 5.4]. Dette studies data går op til højere SDS:BSA molforhold, og dette sammenholdt med ITC data [Appendiks A] og cirkulær dichroisme målinger [Takeda 2002] giver en mulighed for at give et bud på et fasediagram for BSA.

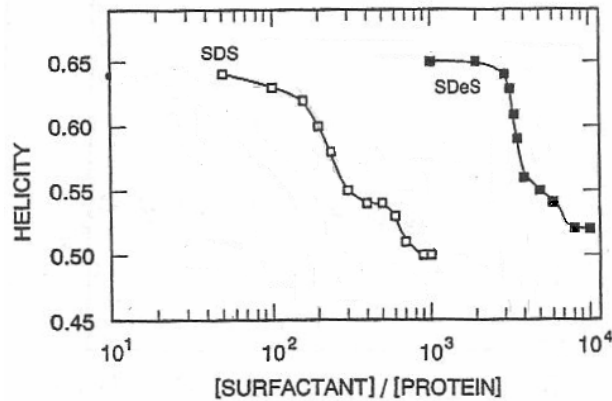


Figur 5.4: SDS påvirkning af  $T_m$ . Data fra dette studie kombineret med data fra tidligere studier [Giancola 1997 og Deep 2001]. Der ses tydeligt samme tendens. I molforholdet 1-10 finder de tidligere studier et bifase system, hvilket der også er tegn på i DSC-data fra dette studie [Appendiks C].

Dette studie finder i lighed med de tidligere studier [Deep 2001 og Giancola 1997], at der sker flere transitioner i molforholdet 1 til 10, hvilket kræver en uddybelse med hensyn til, med hvilken mekanisme denne todelte transition finder sted. Dette er allerede blevet diskuteret tidligere i afsnittet. I arealet under den i figur 5.4 viste graf er BSA i sit native stadie og bibeholder tertiær struktur og formentlig funktion, men smeltetemperaturer varierer mellem 62 °C uden SDS og til omkring 85°C ved molforholdet 10.

Det native stadie afgrænses af en termisk denaturering og af en SDS induceret denaturering. Den termiske denaturering fastsættes ud fra de i rapporten præsenterede data fra DSC [Figur 5.4]. Den SDS inducerede denaturering er kendt fra ITC data [Appendiks A] og finder sted ved molforholdet 124 og temperaturen 22°C. Efter det sidste punkt i DSC målingen, hvor  $T_m$  er 68 °C ved molforholdet 100 [Figur 5.4], går enthalpien for målingerne mod nul, hvilket tyder på, at der i det område forekommer denaturering uden termisk påvirkning. Det kan derfor sluttes, at det sidste punkt skal forbindes med punktet fra ITC data, så DSC-linjen forlænges ind til molforholdet 124.

Ved at gå ud fra ITC data kan der ses en betydelig varmeudvikling ved 22°C og molforhold 230, [Appendiks A]. Dette foreslås at være en yderligere udfoldning af det allerede denaturerede protein. Det denaturerede protein har formentlig mistet størstedelen af sin tertiære struktur og dermed også sin funktion, mens den sekundære struktur formentlig stort set er intakt [Takeda 2002]. Ved videre binding af de negativt ladede SDS molekyler til BSA ophobes negative ladninger, hvilket ved molforholdet 230 kan være nok til at smelte noget af den sekundære struktur såsom  $\alpha$ -helixer og  $\beta$ -sheet. Denne konklusion er understøttet af Takeda et al, som i deres studie ved cirkulær dichroisme finder, at der er et markant fald i heliciteten af BSA ved et molforhold på over 200 [Figur 5.5].



**Figur 5.5:** Heliciteten af BSA målt ved cirkulær dichroism ved indvirkning af SDeS og SDS [Takeda 2002]. Det observeres, at heliciteten falder drastisk ved henholdsvis 3000 og 200 surfactant:BSA molforhold.

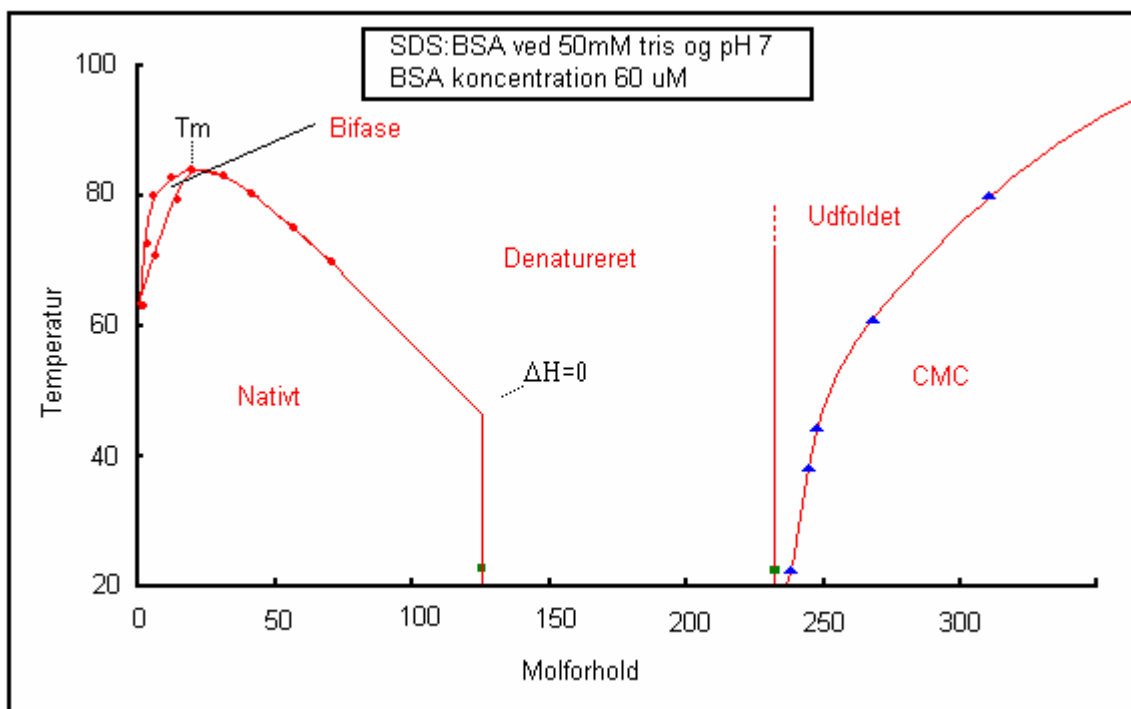
Hvordan, denne yderligere udfoldning af det denaturerede BSA afhænger af temperatur, er bestemt af, hvad mekanismen for udfoldningen er.

Mekanismen kan være afhængig af micelledannelse, som i "necklace and bead" modellen. Dette vil formentligt medføre, at transitionen forekommer ved højere molforhold og højere temperatur. Den anden mulighed er, at transitionen er termisk betinget. Dette vil betyde, at udfoldningen af det denaturerede protein foregår ved lavere molforhold, jo højere temperaturen er. Umiddelbart er den første mekanisme mest realistisk, da den er beskrevet for andre systemer. Data fra dette studie tyder dog på en yderligere termisk afhængig udfoldelse ved 94°C; molforhold 115 og 91°C; molforhold 130 [Appendiks C]. Enthalpien for de to udfoldninger er henholdsvis 34 kJ/mol og 14 kJ/mol, hvilket svarer til 1/10 af denatureringsenthalpien. Det er ikke muligt at konkludere noget med de nuværende data, hvorfor dette område foreslås yderligere undersøgt.

En ligning for ligevægten mellem de tre faser kunne se således ud:



Hvor både transitionen mellem det native (N) og denaturerede (D) stadie, samt transitionen til det udfoldede (U) fra det denaturerede, er afhængig af surfactant binding og temperatur. Dette illustreres mere fyldestgørende ved udfærdigelsen af et fasediagram for BSA-SDS systemet [Figur 5.6].

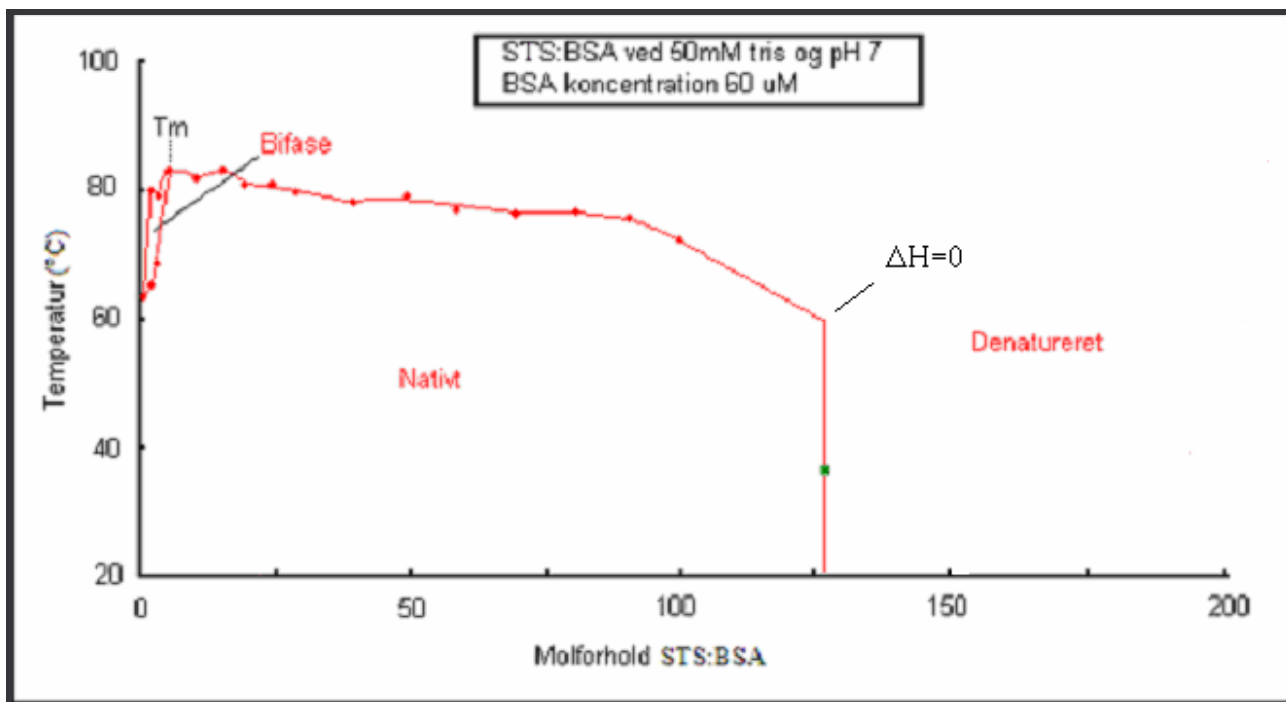


Figur 5.6: Fasediagram for BSA:SDS systemets faser ved temperatur og molforhold af SDS:BSA. [●] Baseret på data fra tidligere diagram. [▲] Er baseret på en beregning af CMC med den antagelse, at BSA binder 200 SDS molekyler [Rendall 1976]. [■] Er baseret på ITC data [Appendiks A]. Den native konformation er det område, hvor proteinet bibeholder sin tertiære struktur. Bifasesystemet er området ved lave molforhold, hvor der observeres flere transitionstoppe i DSC målingerne. Det udfoldede område er der, hvor det denaturerede proteins sekundære struktur løsnes. CMC er det område, hvor den frie koncentration af SDS ikke stiger mere på grund af micelledannelse.

Den kritiske micellekoncentration beregnet ud fra data præsenteret i kapitel 2.2 er desuden repræsenteret i figur 5.6, selvom det ikke er en faseovergang for BSA. Dette begrundes med, at det er det punkt, hvor monomerkoncentrationen af SDS ikke kan hæves mere, fordi alle yderligere SDS molekyler vil micellere. Desuden er det relevant for "necklace and dead" modellen, der er afhængig af micelledannelse omkring proteinbundne SDS molekyler. Beregningen af CMC kurvens placering er baseret på en antagelse om, at hvert BSA molekyle binder 200 SDS molekyler [Rendall 1976].

## 5.5 Fasediagram ved påvirkning af STS

Der konstrueres et fasediagram for BSA [Figur 5.7] ved STS:BSA molforhold 0-200, en temperatur skala fra 20-100 °C ud fra DSC og ITC data. Det var ikke umiddelbart muligt at finde det molforhold i litteraturen, hvor  $\alpha$ -helix transitionen forekommer for STS-BSA, men ITC data tyder på, at denne ligger efter CMC ved en BSA koncentration på 20  $\mu$ M [Appendiks A].

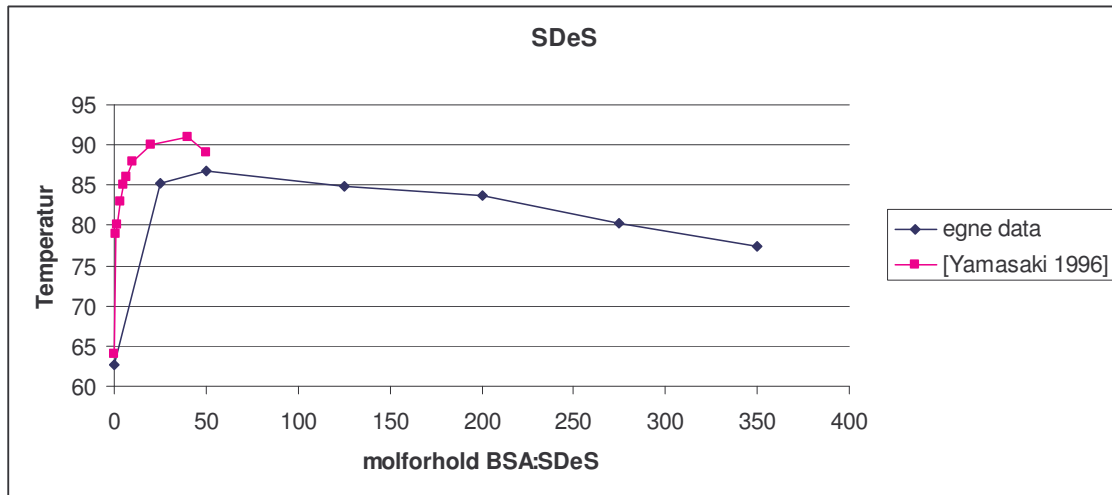


Figur 5.7: Fasediagram for forskellige molforhold af STS:BSA på baggrund af DSC og ITC målinger. [●] målte værdier af  $T_m$ . [■] det ved ITC fundne molforhold, hvor BSA ( $20\mu\text{M}$ ,  $50\text{mM}$  TRIS og  $\text{pH}=7.0$ ) er denatureret af STS.  $T_m$  på fasediagrammet angiver  $T_{m,\text{max}}$  for surfactant-BSA systemet. Den røde linje, der følger de plottede data punkter, angiver den øvre grænse for, hvilke molforhold og temperaturer BSA er i ved sin native konformation. Den angivne bifase er det område, hvor BSA har to transitioner og reelt befinder sig i to faser: surfactant-fattig og surfactant-rig.

Da der ikke blev udført målinger ved molforhold højere end 100 er sidste del af kurven for fasetransitionen forbundet til ITC datapunktet, der viser, at denatureringen af BSA ved temperaturen  $35^\circ\text{C}$  er næsten fuldkommen ved STS:BSA molforhold på 125. Denne ekstrapolering forudsætter, at der ikke er termodynamisk forskel på den surfactant og den termisk induceret denaturerede konformation af BSA, da proteinets entalpi er en state-function.

## 5.6 Fasediagram ved påvirkning af SDeS

Der er ligesom for SDS og STS forsøgt opstillet et fasediagram for denatureringen af BSA ved tilstedeværelse af SDeS. Dette er udført på baggrund af egne DSC data og andres [Yamasaki 1996] [Figur 5.8], samt ITC data [Appendiks A].

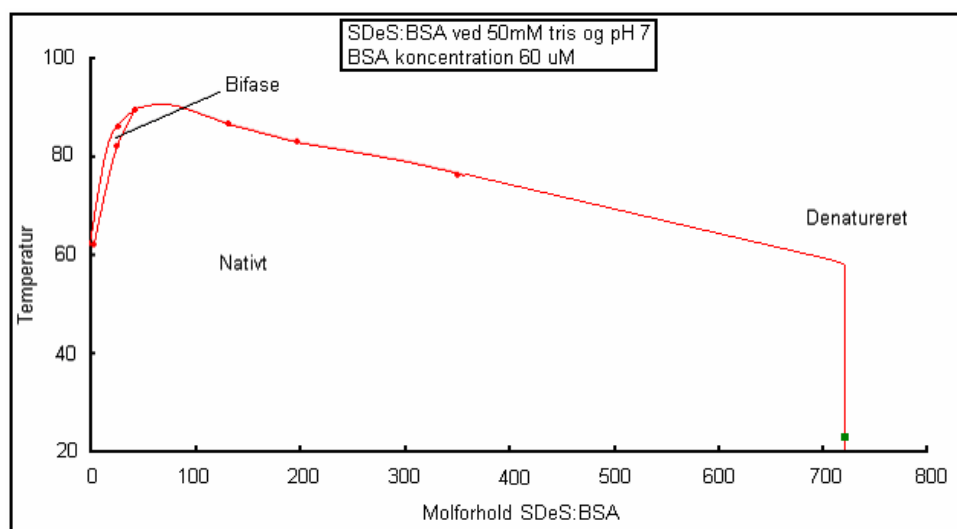


Figur 5.8: Sammenligning af de i studiet fremkomne data med data fra Yamasaki et al.

Som det ses i figur 5.8 stiger  $T_m$  med molforholdet 40 – 50, hvorefter den langsomt falder til molforhold 350, hvorefter det ikke er muligt at opnå brugbare data. Data stemmer ikke helt overens med resultaterne fra Yamasaki 1996, hvilket kan skyldes forskellige BSA koncentration, men der observeres dog samme udvikling i  $T_m$ .

Figur 5.9 viser det opstillede fasediagram for den termiske denaturering af BSA ved forskellige SDeS mængder. Som det ses skal der mange SDeS molekyler til for at denaturere BSA helt, hvilket skyldes, at SDeS har den laveste målte molforhold er 25, ses den tidligere diskuterede bifase kun som en skulder på termogrammet ved molforhold 25 [Appendix D]. Det er dog forsøgt at indtegne den i fasediagrammet ud fra den ene  $T_m$ -værdi fra skulderen, da den ifølge tidligere nævnte model skulle være til stede.

Det er ikke muligt, at se transitionen fra denatureret til udfoldet protein ud fra ITC målingerne, som det var for SDS:BSA systemet. Dette skyldes, at udfoldningen af  $\alpha$ -helix først forekommer ved molforhold ved omkring 3000 [Figur 5.6], hvor det på baggrund af ITC målingerne [Appendiks A] er vurderet, at CMC formentligt er indtrådt.



Figur 5.9. Fasediagram for BSA ved temperatur og molforhold af SDeS:BSA. [●] data fra tidligere diagram med egne data sammenlignet med andre undersøgelser resultater. [■] Data baseret på ITC målinger. Det native stadiet er der, hvor proteinet stadig har sin tertiære struktur, mens det denaturerede er stadiet, hvor proteinet har mistet sin tertiære struktur. Bifasen er området, hvor der findes flere  $T_m$ -toppe for det samme molforhold.



## **5.7 Komparativ analyse af fasediagrammerne**

Ud fra de data der er blevet præsenteret i fasediagrammerne af BSAs denaturering og udfoldning ved de forskellige surfactanter, ses der et billede af et proteins faser. Ved lave molforhold stabiliseres BSA af både specifikke og uspecifikke interaktioner med det native protein. Før  $T_{m,max}$  findes et uspecificeret bifaseområde, med flere transitioner. Efter  $T_{m,max}$ , vil endnu flere uspecifikke bindinger, til den denaturerede konformation, destabiliserer proteinet. Ved endnu højere molforhold sker en ekstra transition, hvor surfactanternes negativt ladede hovedgrupper menes at udfolde proteinet yderligere, ved en elektrorepulsiv effekt, eventuelt er denne transitionen afhængig af micelledannelse.

Udover BSA:SDS-systemet er det klart bedst beskrevet, ser det system også ud til at have en unik kombination af egenskaber, som ikke observeres ved SDeS og STS; Udfoldningen af den sekundære struktur, som kun ses i SDS:BSA og ikke for de to andre surfactanter. Det er meget muligt, at STS ikke kan opnå høj nok monomerkoncentration på grund af micelledannelse, da CMC er betydeligt lavere for en C14 kæde i forhold til en C12 som i SDS. Da antallet af proteinbundne surfactanter er afhængig af monomer koncentrationen [Rendall 1976], er det sandsynligt at der ikke kan bindes nok STS til BSA til at inducere udfoldning af den sekundære struktur. Dette er på trods af at STS har en højere affinitet for BSA end SDS, [Tabel 5.1] Imodsætning til STS, binder SDeS formentligt ikke effektivt nok til BSA, så der kan samles nok til at fremprovokerer udfoldelse af sekundær struktur. Dette ses på [Figur 5.5] hvor der kræves et molforhold på 3000 for at udfoldelse af den sekundære struktur finder sted [Takeda 2002]. Dette ligger langt ude for det i rapporten undersøgte område. Det er altså bemærkelsesværdigt at SDS har evnen til at udfolde sekundær struktur, mens længere og kortere kædede surfactanter ikke har denne evne på grund af de modsatrettede effekter, bindingsaffinitet og opløselighed (CMC).

## **6. Konklusion**

Rapporten finder at det er muligt at opstille fasediagrammer for BSA ved påvirkning af de tre surfactanter SDeS, SDS og STS. De relevante faser for BSA er et nativt stadie, et denatureret, et bifasesystem, bestående af de to førstnævnte, og et udfoldet stadie. I den native konformation bevarer proteinet sin tertiære struktur. Proteinet kan denatureres ved både termisk og surfactant påvirkning, hvor den tertiære struktur mistes, mens den sekundære struktur består. Ved høje koncentrationer af SDS observeres tab af sekundær struktur, hvilket defineres som et udfoldet stadie. Denne udfoldelse kan desuden induceres termisk, hvilket indikeres af denne undersøgelse, men skal undersøges yderligere før der kan drages en konklusion. For SDeS og STS er der ikke observeret udfoldelse af den sekundære struktur, hvilket kan skyldes modsatrettede effekter af surfactanternes opløselighed (CMC) og deres bindingsaffinitet. Ved et molhold over nul findes der for alle de tre surfactanter et bifasesystem der fortsætter op til  $T_{m,max}$  og giver to forskellige transitionstemperaturer. De i rapporten opnåede data støtter en bifasemodel foreslået af Shrake et al [Shrake 1988], da data viser en tendens til bifasen ender i  $T_{m,max}$ .

Som foreslået af Yamasaki et al. korrelerer kædelængden på surfactanten med dens evne til at stabilisere BSA. Således er rækkefølgen i stabiliserende effekt målt ved  $T_{m,max}$ : SDeS > SDS > STS, mens bindingstallet ved  $T_{m,max}$  følger samme rækkefølge: SDeS >> SDS >> STS. Denne sammenhæng kan overføres til andre kædelængder, men begrænses nedad ved SHS enten af steriske grunde eller mangel på hydrofobe effekter. Ved længere carbonkæder formodes der at være en grænse, da opløseligheden falder kraftigt med kædelængden. Forskelle på de tre surfactanters egenskaber, som aflæst i fasediagrammerne, kan relateres til deres respektive kædelængder og dermed deres evne til at lave hydrofobe interaktioner. Dette er relevant både for binding til proteiner, men også deres opløselighed givet ved CMC. For at få et fuldt billede af BSAs faser ved påvirkning af de tre surfactanter kræves dog yderligere undersøgelser, som foreslået i denne rapport.

## **7. Referenceliste**

Ananthapadmanabhan. (1993). Interactions of surfactants with polymers and proteins / ed.: E.D. Goddard, K.P. Boca Raton : CRC Press, c1993. - 427 s.

Anson, M. L. (1939). Denaturation of proteins by detergents and bile salts. *Science (Washington, DC, United States)*, 90 256-7.

Bhattacharya AA, Grune T, Curry S. (2000). Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin  
*Journal of Molecular Biology* 303 (5): 721-732.

Brandt J., Andersson L.O. (1976). Heat denaturation of human serum-albumin – migration of bound fatty-acids. *International journal of peptide and protein research* 8 (1): 33-37

Carter DC, Ho JX. (1994). Structure of serum-albumin. *Advances in Protein Chemistry* 45: 153-203.

Chi E. Y., Krishnan S., Randolph T.W., Carpenter J.F. (2003). Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation.  
*Pharmaceutical Research* 20(9), 1325-1336.

Cooper A. (1999). Thermodynamics of Protein Folding and Stability. *Protein: A Comprehensive treatise, volume 2*, 217-270. Ed. Geoffrey Allen, Pub. JAI Press Inc.

Cooper A. & McAuley-Hecht K.E. (1993). Microcalorimetry and the molecular recognition of peptides and proteins. *Phil.Trans.R.Soc. Lond. A* 345, 23-35.

Creighton T.E. (1993). Proteins : structures and molecular properties / Thomas E. Creighton.  
- 2. ed. New York : W.H. Freeman, c1993. - xiii, 507 s.

Curry S., Mandelkow K., Brick P., Franks N. (1998). Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol.* Sep;5(9):827-35.

Deep S. & Ahluwalia J.C. (2001). Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys* 3, 4583-4591.

DeepView / Swiss-PdbViewer 3.7. Copyright © 1995-2001 GlaxoSmithKline.

Fukada H., Sturtevant J.M., & Quioco F.A. (1983). Thermodynamics of the binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of Escherichia coli. *J. Biol. Chem* 258, 13193-13198.

Giancola C, DeSena C, Fessas D, et al. (1997). DSC studies on bovine serum albumin denaturation - Effects of ionic strength and SDS concentration *Int. J. Biol. Macro Mol.* 20 (3): 193-204

HyperChem™ 5.01 for windows. Copyright © 1996 Hypercube, Inc.

Jones, M. N. (1992). Surfactant interactions with biomembranes and proteins. *Chemical Society Reviews* 21(2), 127-36

Kelley D. & McClellents D.J. (2003). Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids* 17, 73-85.

Kragh-Hansen, Ulrich; Hellec, Florence; De Foresta, Beatrice; Le Maire, Marc; Moller, Jesper V. (2001). Detergents as probes of hydrophobic binding cavities in serum albumin and other water-soluble proteins. *Biophysical Journal* 80(6), 2898-2911.

Morrisett J.D., Pownall H.J., Gotto A.M. (1975). Bovine Serum-Albumin – Study of fatty-acid and steroid binding-sites using spin-labeled lipids. *Journal of biological chemistry* 250 (7): 2487-2494

Nielsen A.D., Arleth L., Westh P. (2005). Interactions of humicola insolens cutinase with an anionic surfactant studied by small-angle neutron scattering and isothermal titration calorimetry. *In print*.

Nielsen A.D., Borch K. & Westh P. (2000). Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1479, 321-331.

Origin ® 7.0 DSC modul. Copyright © 1991-2002 MicroCal.

Perkins RC, Abumrad N, Balasubramanian K, et al. (1982). Equilibrium binding of spin-labeled fatty-acids to bovine serum-albumin – suitability as surrogate ligands for natural fatty-acids *Biochemistry* 21 (17): 4059-4064.

Peters, T.J. (1996). All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications / by Theodore Peters, Jr. San Diego, Calif.: Academic Press, c1996. - xx,432 s., tav.

Peters T. (1985). Serum-albumin. *Advances in Protein Chemistry* 37: 161-245.

Peters T, Anfinsen C.B. (1950). Net production of serum albumin by liver slices *Journal of Biological Chemistry* 186 (2): 805-813

Pico, G.M. (1997). Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* 20, 63-73.

Ptitsyn, O. B. (1995). Molten globule and protein folding. *Advances in Protein Chemistry* 47 83-229.

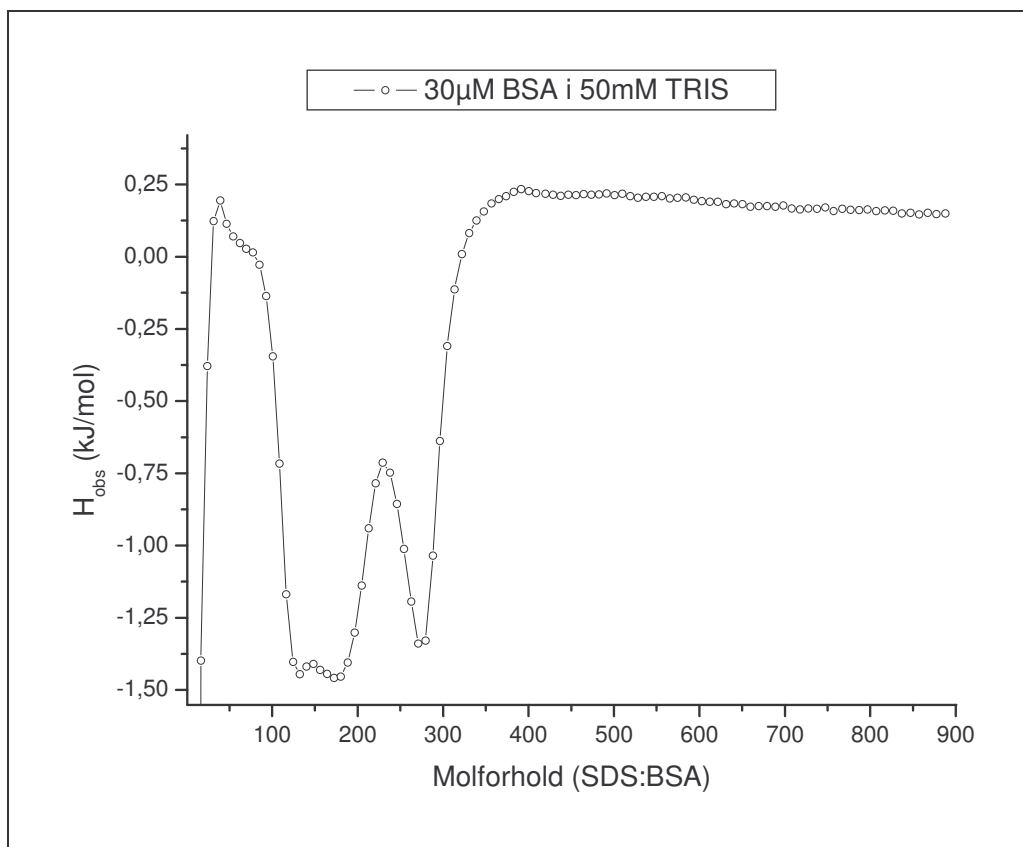
Reed RG, Feldhoff RC, Clute OL, et al. (1975). Fragments of bovine serum-albumin produced by limited proteolysis – conformation and ligand-binding. *Biochemistry* 14 (21): 4578-4583.

- Rendall, H.M. (1976). Use of a surfactant-selective electrode in the measurement of the binding of anionic surfactants to bovine serum albumin. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 72(2), 481-4.
- Saber M.A., Stockbauer P., Moravek L., et al. (1977). Disulfide bonds in human-serum albumin. *Collection of Czechoslovak chemical communications* 42 (2): 564-579.
- Shrake, Andrew; Ross, Philip D. (1990). Ligand-induced biphasic protein denaturation. *Journal of Biological Chemistry* 265(9), 5055-5059.
- Shrake, A., Ross P.D. (1988). Biphasic denaturation of human albumin due to ligand redistribution during unfolding. *Journal of Biological Chemistry* 263(30), 15392-9.
- Sturtevant, J.M. (1987). Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Annual Review of Physical Chemistry* 38 463-88.
- Takeda K., Moriyama Y., Hachiya K. (2002). Interaction of protein with ionic surfactants: Part 1. Binding of surfactants to protein fragments, and conformational changes induced by binding. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*.
- Turro NJ, Lei XG, Ananthapadmanabhan KP, et al. (1995). Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions – The BSA/SDS system *Langmuir* 11 (7): 2525-2533.
- Vasilescu M, Angelescu D, Almgren M, et al. (1999). Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods. *Langmuir* 15 (8): 2635-2643.
- Yamasaki M., Yamashita T.I., Yano H., Tatsumi K. & Aoki K. (1996). Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin IV. Effect of anionic surfactants with various lengths of hydrocarbon chain. *International Journal of Biological Macromolecules* 19, 241-246.
- Yamasaki, Miyuki; Yano, Hiroshige; Aoki, Koichiro. (1992) Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: III. Effect of sodium dodecyl sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules* 14(6), 305-12.

# Appendiks A

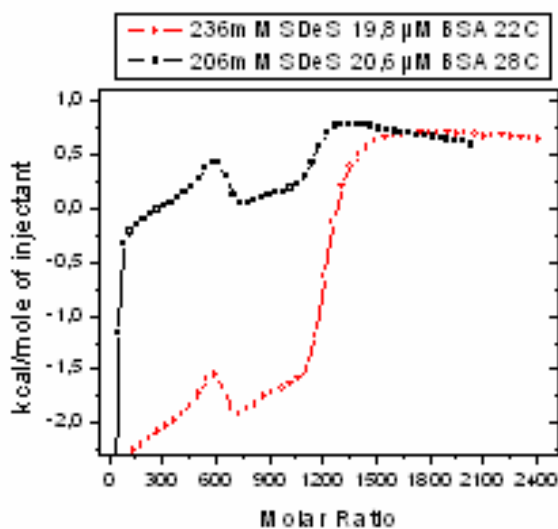
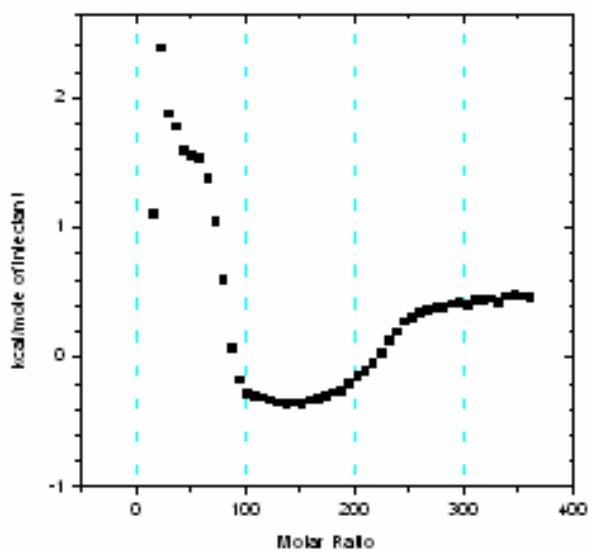
ITC data fra forsøg udført af Lars Lundby Hansen

SDS:BSA ved 30uM BSA, 50mM TRIS og 22°C



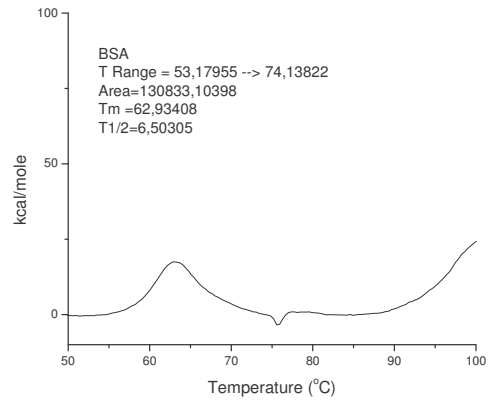
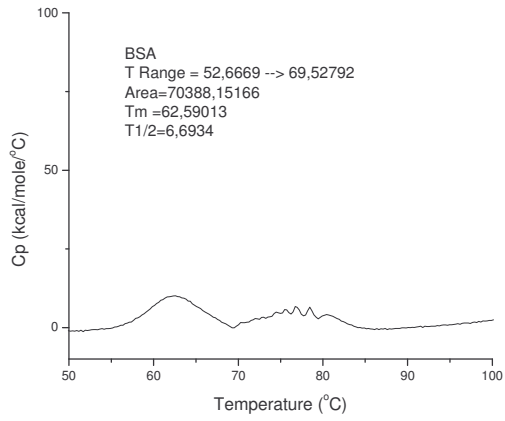
STS:BSA ved 20uM BSA, 50mM TRIS og 35°C

SDeS:BSA ved 20uM BSA og 50mM TRIS



## Appendiks B

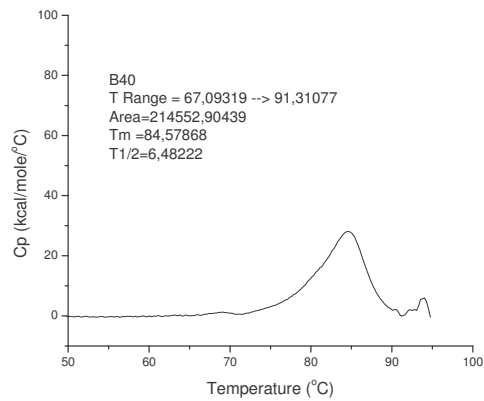
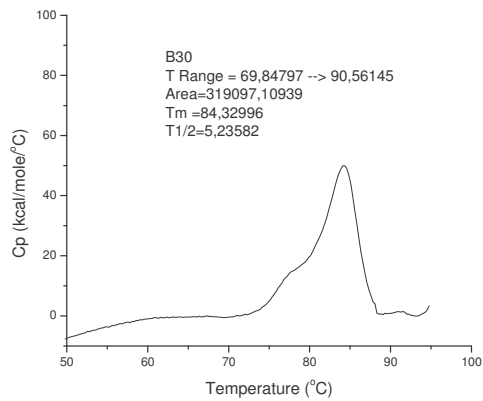
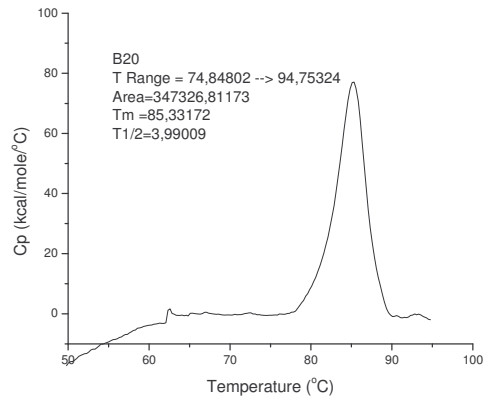
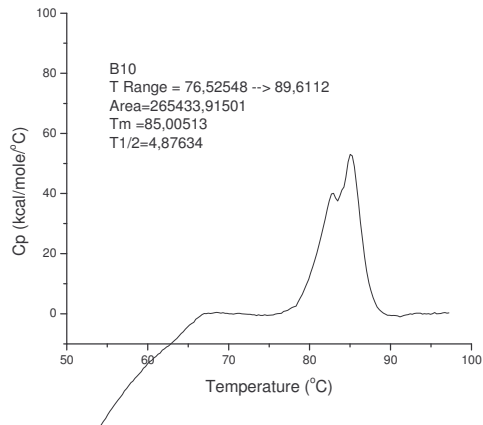
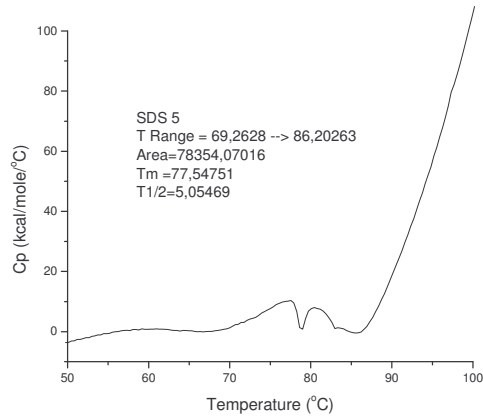
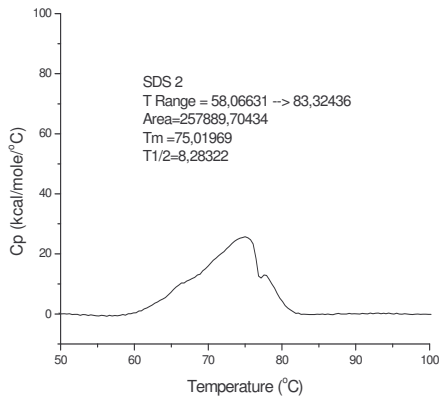
DSC data for BSA ved 60 $\mu$ M i 50 mM TRIS og EDTA, uden tilstedeværelse af surfactanter



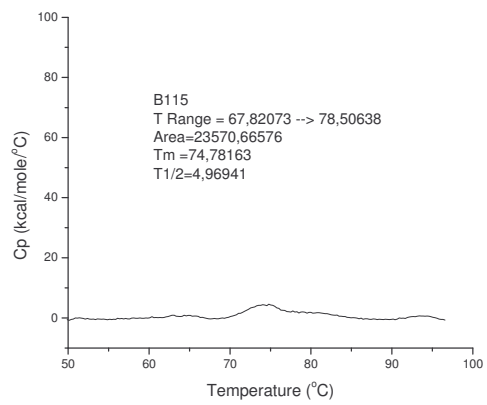
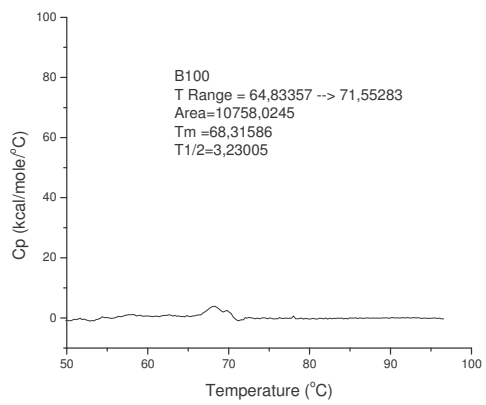
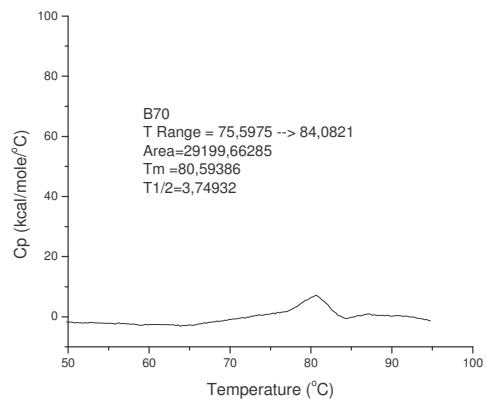
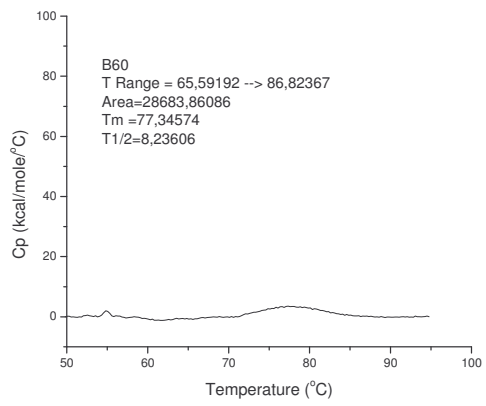
# Appendiks C

## SDS

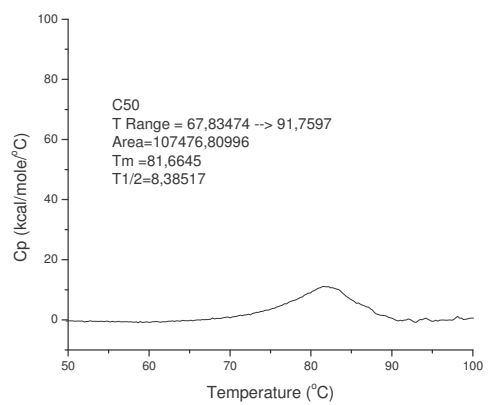
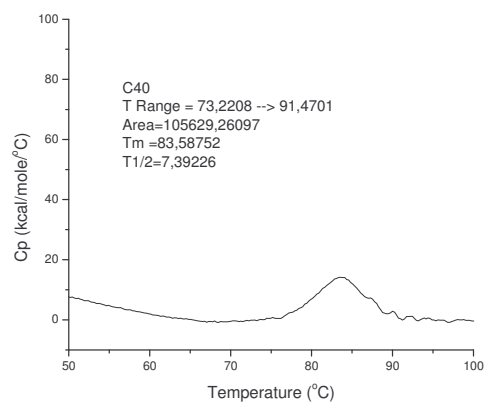
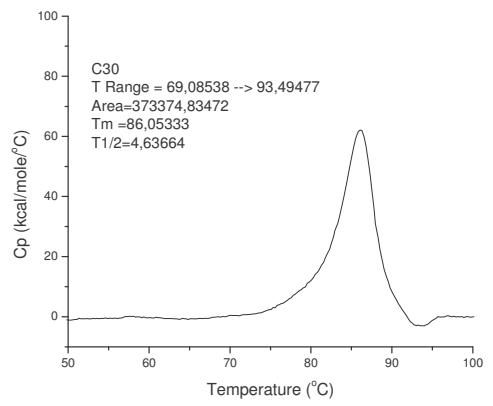
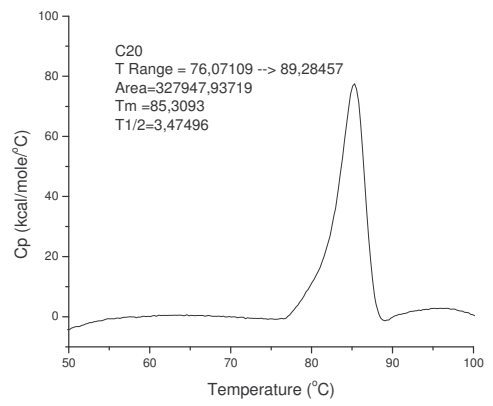
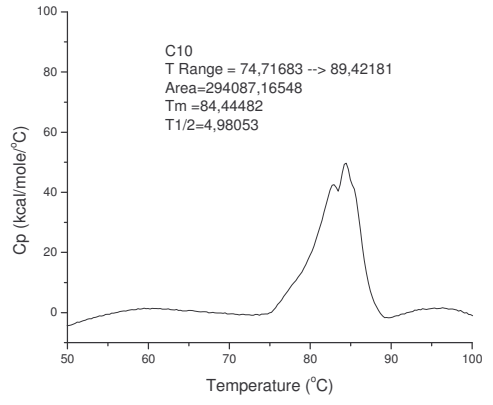
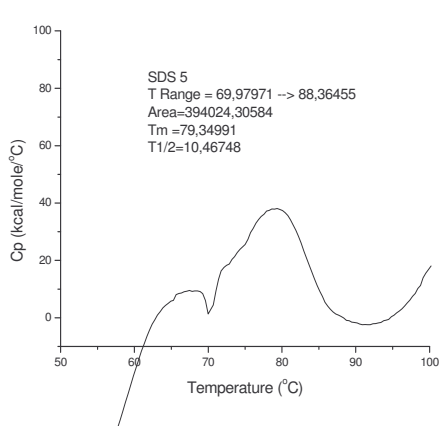
B-serie: DSC data for SDS:BSA i molforhold 2, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 70, 100 og 115

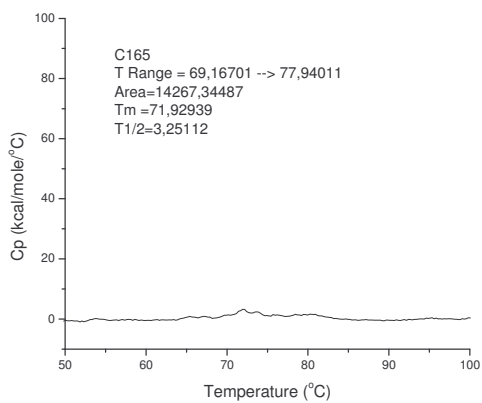
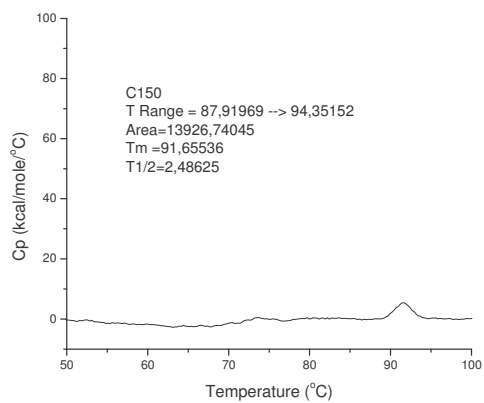
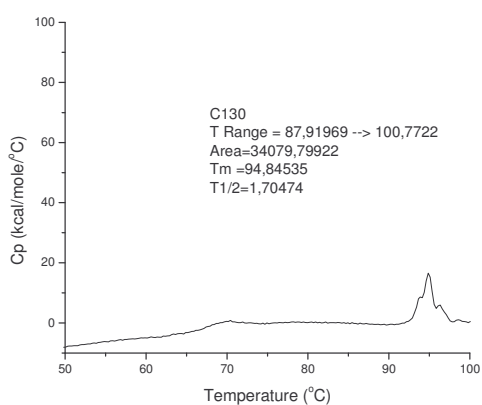
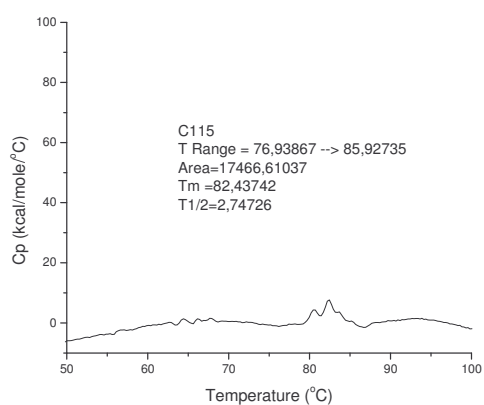
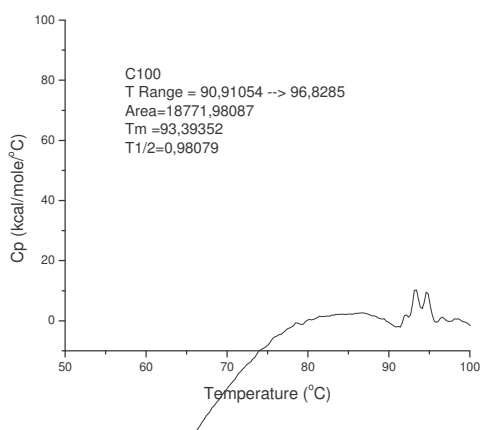
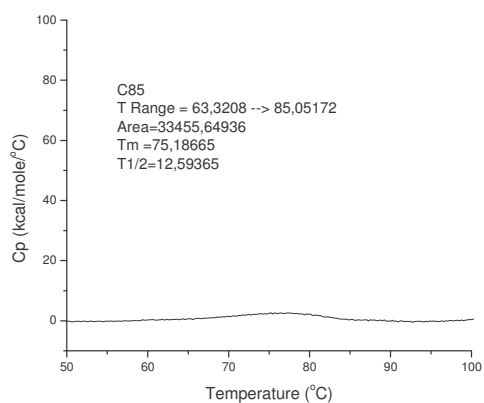






**C-serie:** DSC data for SDS:BSA i molforhold 5, 10, 20, 30, 40, 50, 85, 100, 115, 130, 150 og 165

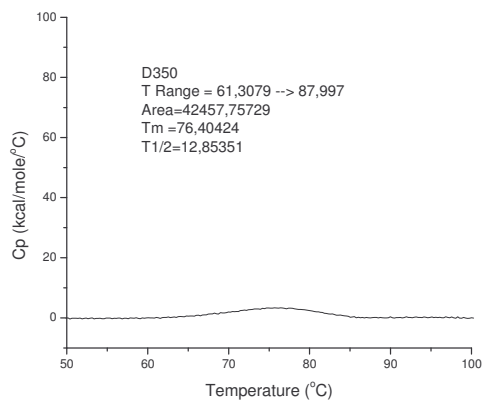
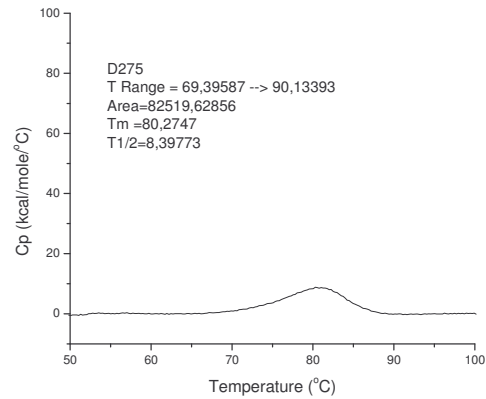
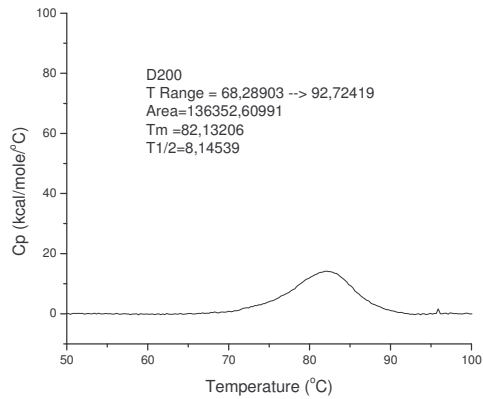
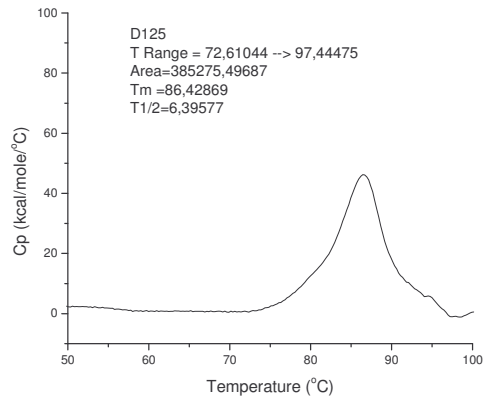
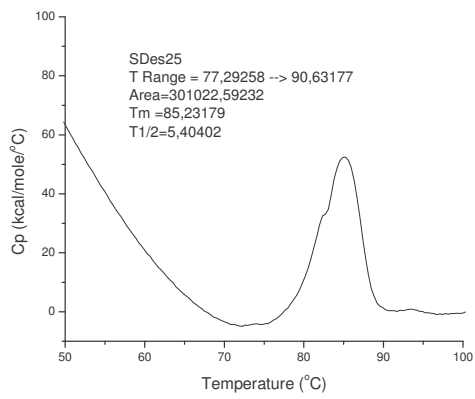




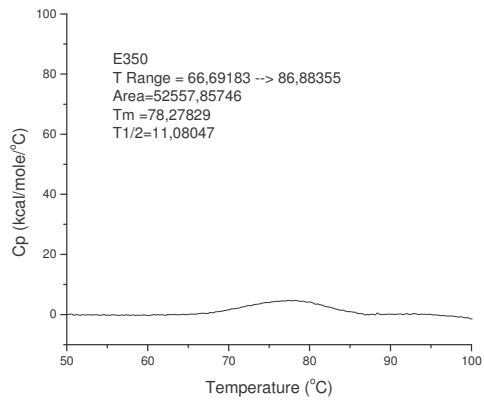
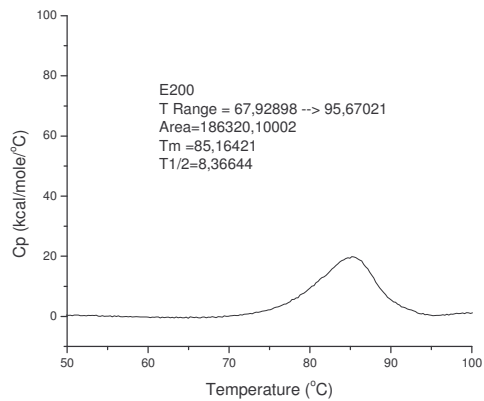
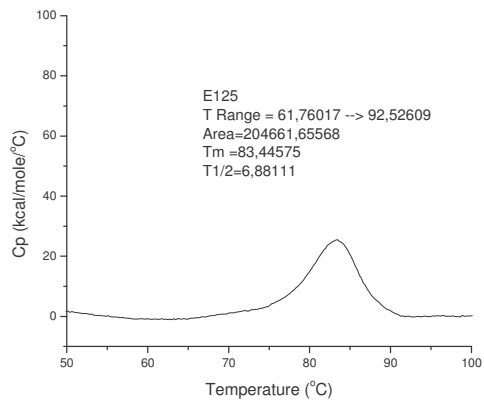
# Appendiks D

## SDeS

D-serie: DSC data for SDeS:BSA i molforhold 25, 125, 200, 275 og 350



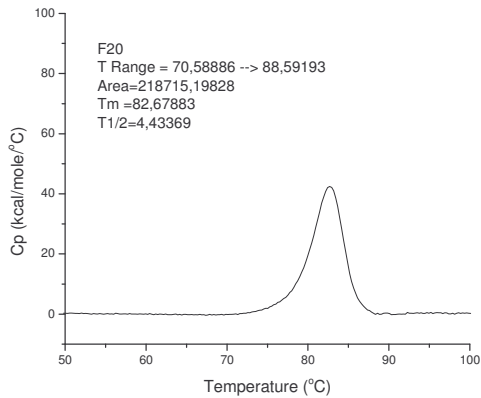
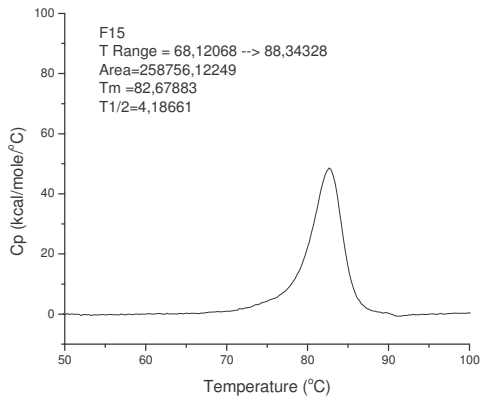
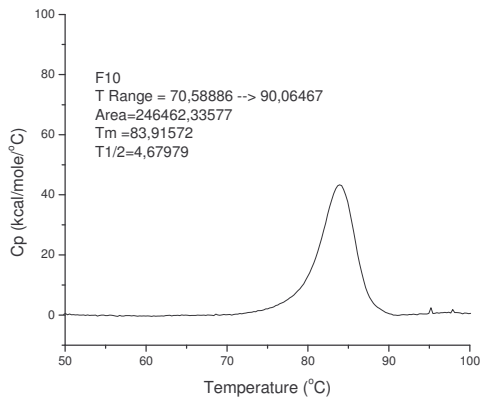
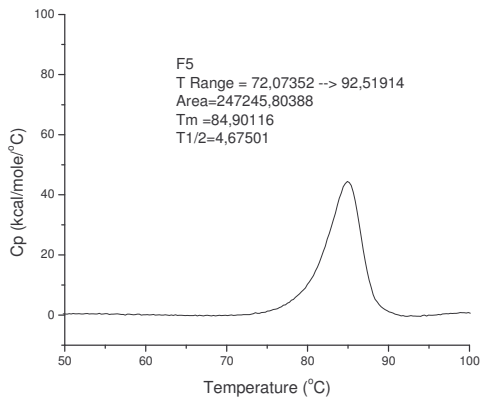
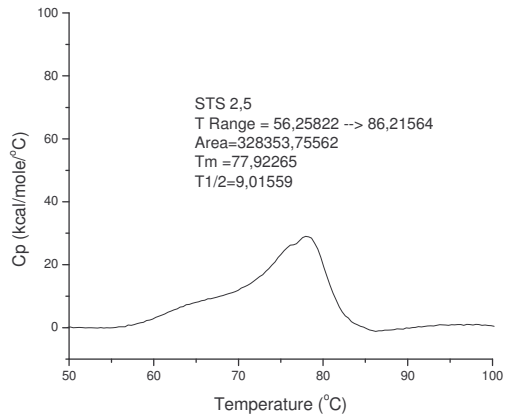
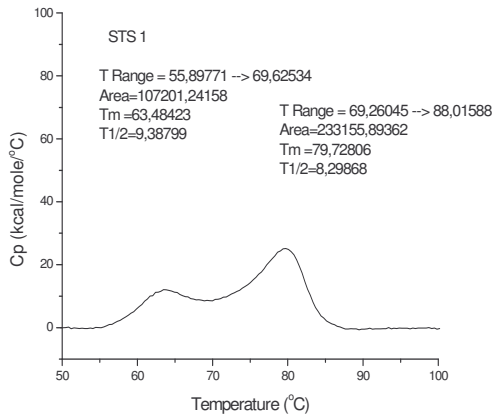
**E-serie:** DSC data for SDeS:BSA i molforhold 125, 200 og 350

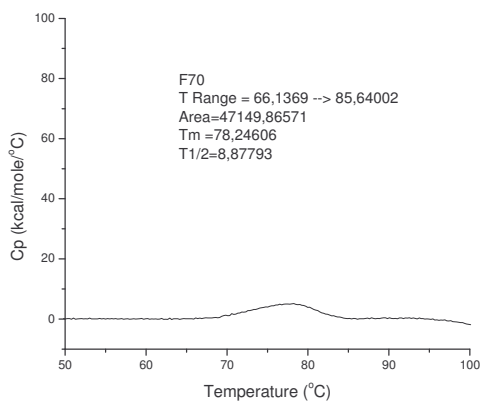
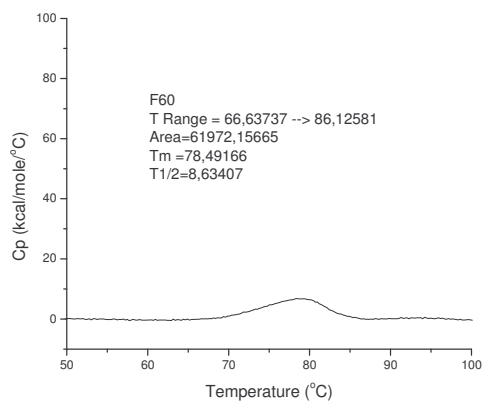
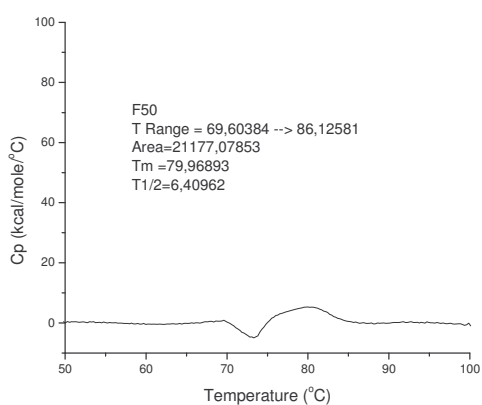
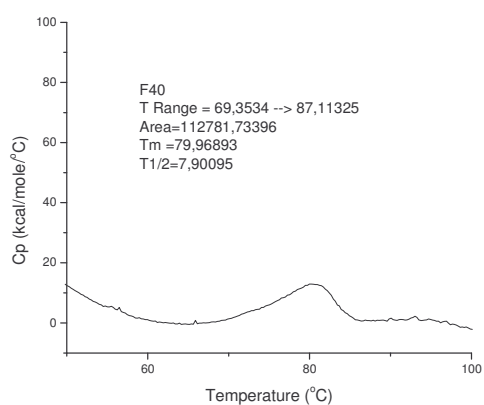
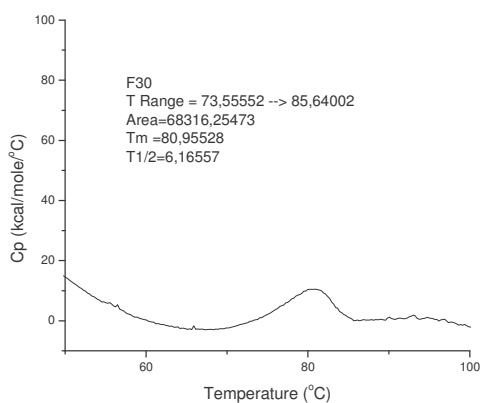
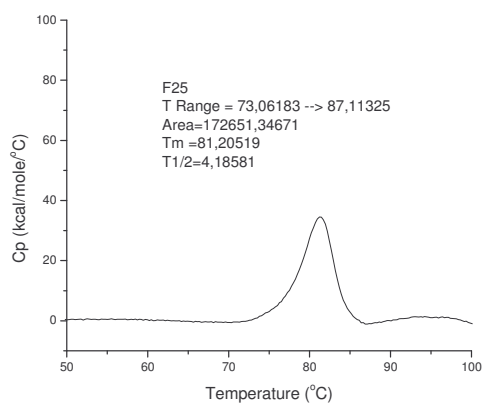


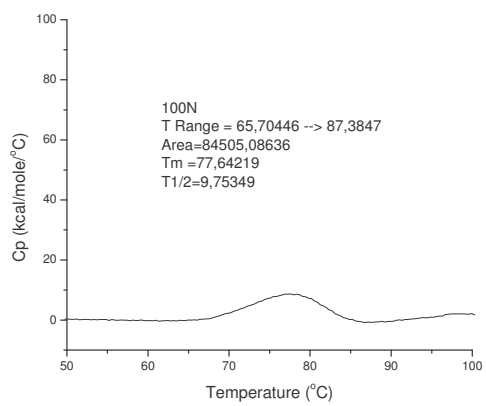
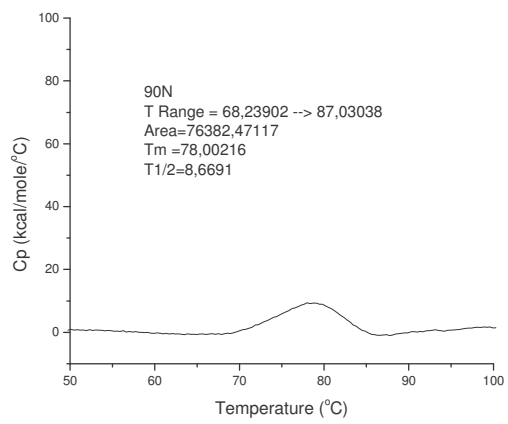
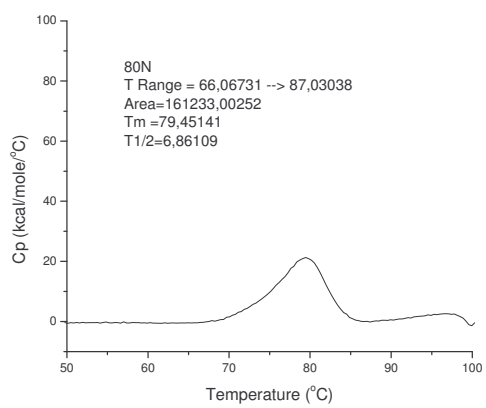
# Appendiks E

## STS

F-serie: DSC data for STS:BSA i molforhold 1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 og 70.

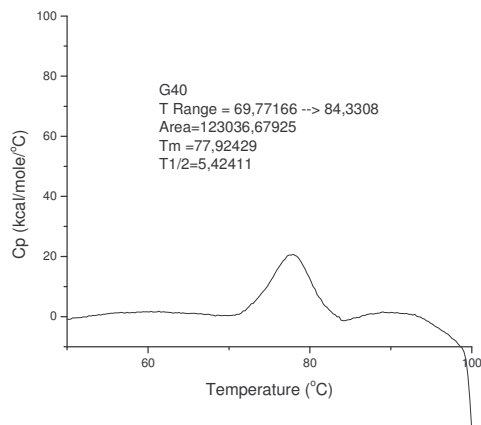
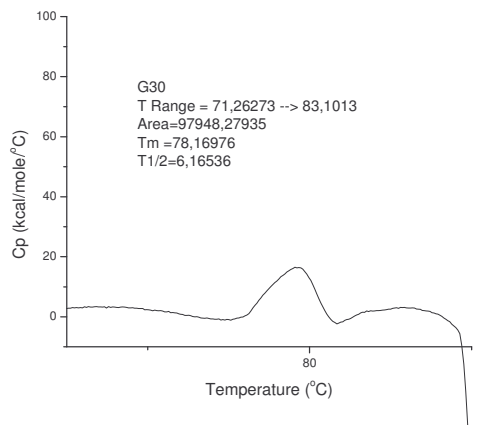
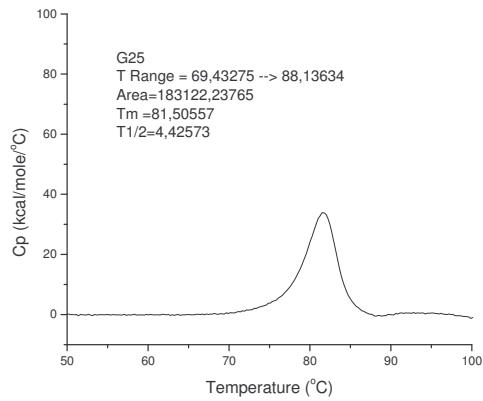
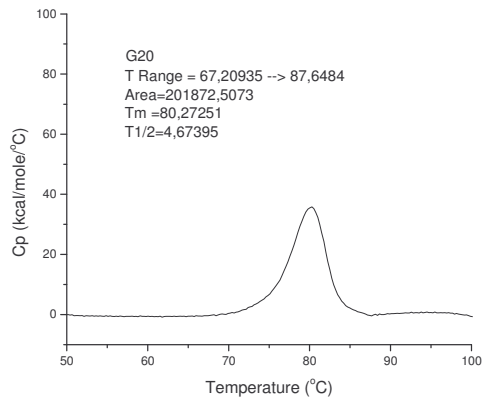
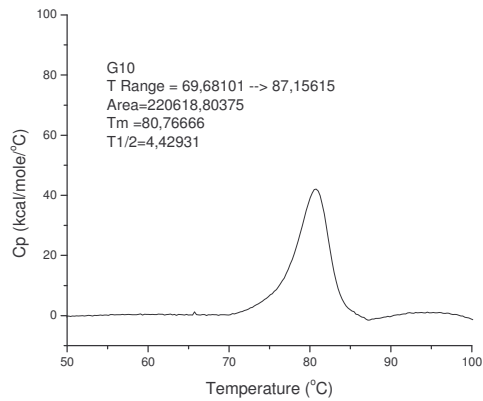
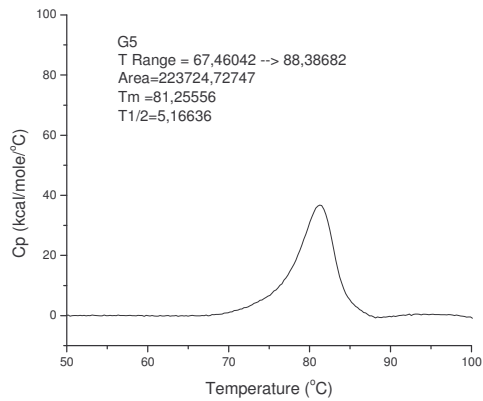








## G-serie: DSC data for STS:BSA i molforhold 5, 10, 20, 25, 30, 40, 80, 90 og 100



## Appendiks F

### De i rapporten benyttede forkortelser

#### Generelt:

DSC (Differential Scanning Calorimetry)

ITC (Isothermal Titration Calorimetry)

BSA (Bovin Serum Albumin)

$T_m$  (Transitions midtpunkt, smeltepunkt)

$T_{m,max}$  (Maksimalt Transitions midtpunkt)

$\Delta H_{cal}$  (Calorimeter –målt- værdi af  $\Delta H$ )

CMC (Critical Micelle Concentration)

#### Surfactanter:

SHS (Sodium hexasulfat  $C_6$ )

SOS (Sodium octasulfat  $C_8$ )

SDeS (Sodium decylsulfat  $C_{10}$ )

SDS (Sodium dodecylsulfat  $C_{12}$ )

STS (Sodium tetradecylsulfat  $C_{14}$ )