

# Tentamen KFKF01, 2016-05-31

Tillåtna hjälpmedel: Miniräknare (med tillhörande handbok), utdelat formelblad med tabellsamling.

**Slutsatser skall motiveras och beräkningar redovisas. Tag för vana att alltid göra en rimlighetsbedömning.**

För godkänt krävs att totala poängantalet på tentamen och eventuell inlämningsavgift är minst 30.

1. I löslighetslaborationen på kursen utförde du ett experiment där viss mängd 2-(hydroxyetyl)pyridin (EP) fördelades mellan 1-oktanol- och vattenfas. Då jämvikt inställde sig vid 298 K fann du ungefär  $[EP]_{aq} = 0,18 \text{ mM}$  och  $[EP]_{8ol} = 0,071 \text{ mM}$ .

- Beräkna molbråken EP i oktanol- och vattenfaserna vid jämvikt. Densiteten och molmassan för 1-oktanol är  $0,824 \text{ g/ml}$  respektive  $130,23 \text{ g/mol}$ .
- Beräkna  $\chi_{EP-8ol} - \chi_{EP-H_2O}$  vid aktuell temperatur.
- Förväntar du dig att Bragg-Williamsmodellen fungerar bra för att beskriva fördelningen av EP mellan faserna? Motivera ditt svar utifrån BW-modellens approximationer.

(6p)

2. På en viss yta finns en positivt laddad grupp (+1e) i koordinaten  $(-5, 0, 0) \text{ \AA}$  och en negativt laddad grupp (laddning -1e) i koordinaten  $(5, 0, 0) \text{ \AA}$ . Du får negligera eventuella effekter av ytan i beräkningarna nedan. Sätt  $\epsilon_r = 78$ .

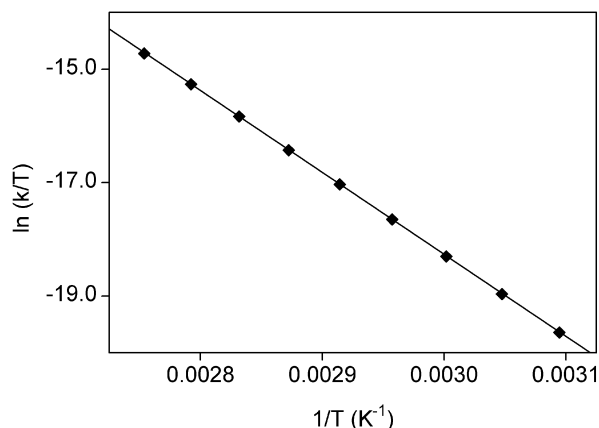
- Rita en bild med laddningarna som visar approximativt hur det elektriska fältet från grupperna är riktat i punkten  $(3, 3, 0) \text{ \AA}$ .
- Beräkna den elektriska potentialen från grupperna i punkten  $(3, 3, 0) \text{ \AA}$ .
- Beräkna vilket arbete som krävs för att föra en natriumjon till punkten  $(3, 3, 0) \text{ \AA}$  från ett mycket stort avstånd.

(6p)

3. Rita en bild som beskriver koordinationen av vattenmolekyler i is. Beskriv sedan vad som händer med strukturen och vätebindningarna då isen smälter, vattnet värms till  $100^\circ\text{C}$  och vid förångning. För full poäng måste du korrekt beskriva hur antalet närmaste grannar, antalet vätebindningar och densiteten ändras samt ge en förklaring till varför smältentropin för vatten är ovanligt låg (jämfört med t.ex. metan).

(6p)

4. Figuren nedan visar temperaturberoendet av hastighetskonstanten  $k$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) för nedbrytning av ditionatjonen ( $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ ) till vätesulfatjoner och svaveldioxid i vatten vid lågt pH (Lente & Fabian, *Inorg Chem* **43**, 4019, 2004). I uppgiften antas att både  $\Delta H^\ddagger$  och  $\Delta S^\ddagger$  är  $T$ -oberoende.

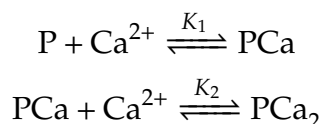


- (a) Bestäm aktiveringsentalpin  $\Delta H^\ddagger$  för nedbrytningen. Observera vilken storhet som är ritad på  $y$ -axeln när du utför beräkningen!
- (b) Man brukar definiera  $E_a = RT^2 \cdot d \ln k / dT$  (så att  $E_a$  är i överensstämmelse med Arrhenius ekvation). Ta fram ett samband mellan  $\Delta H^\ddagger$  och  $E_a$  samt använd detta för att bestämma värdet på  $E_a$  vid  $1/T = 0,0028 \text{ K}^{-1}$ .

(6p)

För att visa att det ni lärt er på kursen har biologisk relevans handlar samtliga uppgifter 5-10 om calbindin D9k, som är ett kalciumbindande protein med två säten som vardera binder en kalciumjon. Varje säte koordinerar kalcium med fyra negativt laddade karboxylatgrupper. Calbindins radie är ca 1,7 nm och dess nettoladdning  $-7e$ . För att tolka experimentella data räcker oftast en stökiometrisk modell av kalciumbindningen, där man inte bryr sig om vilket av sätena den första kalciumjonen binder till. Vi får då

Reaktionsschema 1



I en studie bestämdes kalciumaffiniteterna för en mängd olika mutanter av calbindin vid olika jonstyrkor (Linse et al, *Biochemistry* **30**, 154, 1991). Bl.a. annat fann man då för vildtypen:

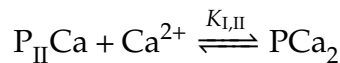
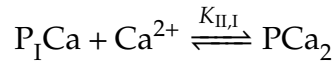
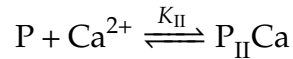
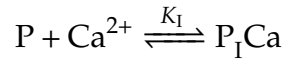
Salt	$K_1$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$K_2$ ( $\text{M}^{-1}$ )
0 M KCl	$1,6 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$
0,15 M KCl	$2,0 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$

I tabellen och samtliga uppgifter nedan är  $T = 298 \text{ K}$ .

5. Teckna bindningspolynomet  $Q$  för reaktionsschema 1 och beräkna hur många kalciumjoner som är bundna per calbindinprotein då  $[Ca^{2+}] = 0,5 \mu M$  och  $0,15 M$  KCl. Beräkna även hur stor andel av proteinet som är fritt samt bundet till en respektive två kalciumjoner. (6p)
6. Diffusionskonstanten för kalciumjoner i cytoplasma (cellvätska) är ungefär  $5,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Brian et al, *Cell Calcium* **8**, 437, 1987).
- (a) Uppskatta den maximala hastighetskonstanten  $k_a$  för association till calbindin i cytoplasma.
- (b) I en studie bestämde Martin m fl (*Biochemistry* **29**, 4188, 1990)  $k_a$  till  $9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Indikerar detta värde att associationen av kalcium till calbindin är diffusionsbegränsad eller ej? Tänk på att du kan behöva göra en enhetsomvandling i jämförelsen med (a). (6p)
7. Uppskatta den elektriska potentialen vid ytan av calbindin samt vid avståndet  $6 \text{ \AA}$  från ytan då halten KCl är  $150 \text{ mM}$ . (6p)
8. (a) Förklara varför man kan vänta sig att bindningskonstanterna är lägre vid  $0,15 M$  salt än vid  $0 M$  salt. Du måste använda begreppen *Poisson–Boltzmanns ekvation*, *elektriska potentialen i bindningssätet* och *jonstyrka* i ditt svar.
- (b) Använd de bägge  $K_1$ -värdena samt Nernsts ekvation för att uppskatta hur många mV lägre den elektriska potentialen är i det aktiva sätet vid den högre salthalten jämfört med den lägre. (6p)
9. Antag att du vill utföra en simulering för att beräkna den elektriska potentialen i bindningssätena vid de olika salthalterna. Du kan välja mellan en Monte–Carlosimulering och en molekylodynamiksimulering. Vilken skulle du välja och varför? Beskriv metoden du väljer, dvs ange principen för hur den utförs och vilka fysikaliska lagar som används i metoden. (6p)

10. Bindningen är positivt kooperativ, dvs när en kalciumjon binder till ett säte ökar affiniteten för det andra sätet. Om man vill beskriva detta behövs en modell med fyra jämvikter där man specifikt beskriver inbindningen till varje säte, enligt

*Reaktionsschema 2*



De romerska siffrorna syftar på säte I och II.  $K_{II,I}$  skall tolkas som jämviktskonstanten för inbindning till säte II när en kalciumjon sitter i säte I.

- (a) Teckna bindningspolynomen  $Q$  (det finns två som är lika) för reaktionsschema 2 och visa, genom jämförelse med bindningspolynomet från uppgift 5, att  $K_1 = K_I + K_{II}$  och  $K_1 K_2 = K_I K_{II,I} = K_{II} K_{I,II}$ .
- (b) Inbindningen av den andra kalciumjonen är positivt kooperativ om  $K_{I,II}/K_I = K_{II,I}/K_{II} > 1$ . Använd sambanden från (a) för att visa att om  $K_I = K_{II}$  så är inbindningen positivt kooperativ om  $K_2 > K_1/4$ .

(6p)

## Lösningar KFKF01, 2016-05-31

1. (a) Eftersom  $x_{EP}(iB) = [EP]/([EP] + [B]) \approx [EP]/[B]^* = [EP] \cdot M_B/\rho_B$  har vi  $x_{EB}(aq) = 3,3 \cdot 10^{-6}$  och  $x_{EP}(8ol) = 1,1 \cdot 10^{-5}$ .
- (b)  $K = x_{EP}(8ol)/x_{EP}(aq) = 3,4$ , vilket ger  $\Delta\mu^\ominus = -RT \ln K = -3,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Eftersom det är väldigt lite EP i bägge faserna kan bägge betraktas som idealt utspädda med avseende på EP och vi har  $\Delta\mu^\ominus = RT(\chi_{EP-8ol} - \chi_{EP-H_2O})$  så att  $\chi_{EP-8ol} - \chi_{EP-H_2O} = -1,2$ .

Man kan också lösa denna genom att tänka sig en tredje fas med ren EP (dvs betrakta lösligheten av EP i oktanol respektive vatten). Man får då  $\Delta_{renEP \rightarrow aq} \mu^\ominus = -RT \ln x_{EP}(aq) = -RT \chi_{EP-H_2O}$  och  $\Delta_{renEP \rightarrow 8ol} \mu^\ominus = -RT \ln x_{EP}(8ol) = -RT \chi_{EP-8ol}$  vars differens blir precis  $\Delta\mu^\ominus$  ovan. Om tänker på detta sätt är det även möjligt att utnyttja ekvationen  $\ln \frac{x_B}{1-x_B} + \chi_{AB}(1-2x_B) = 0$  för bägge jämvikterna, beräkna  $\chi_{AB}$  för bägge (där B alltså är EP i bägge fallen medan A är vatten respektive oktanol) och ta skillnaden mellan dem. De som gjorde någon av dessa "omvägar" på korrekt sätt fick full poäng.

En riktigt snygg lösning som någon gjorde (och som visar på mycket god förståelse) var att direkt skriva upp den kemiska potentialen för EP i bägge faserna (med hjälp av uttrycket för  $\mu$  i BW-modellen), sätta dessa lika och direkt lösa ut skillnaden i  $\chi$ . Det är på detta sätt man gläder en lärare i fysikalisk kemi.

- (c) För full poäng behöver man reflektera kring molekylernas storlek och ev hydrofoba effekter.
2. (a) För full poäng måste man antingen ritat ut fältkomposanterna rätt (den från +-laddningen skall vara ca en fjärdedel så lång som den från --laddningen, ty fältet går som  $1/r^2$ ) och gjort rätt vektoraddition eller ritat ut något så när korrekta fältlinjer mellan laddningarna.
- (b) Avstånden till laddningarna är 8,54 respektive 3,61 Å, vilket med Coulombs lag ger  $\psi = (21,6 - 51,2) \text{ mV} = -29,6 \text{ mV}$ .
- (c) Arbetet ges av  $w = q \cdot \psi = -4,74 \cdot 10^{-21} \text{ J} = -2,86 \text{ kJ mol}^{-1}$ .
3. För full poäng måste man i svaret finna att
- den tetraedriska koordinationen framgår av figuren.
  - då is smälter bryts ca 25% av vätebindningarna och antalet närmaste grannar växer något (från 4 i is) så att. . .
  - densiteten i flytande vatten är högre än i is och att densiteten är maximal vid 4°C.
  - densiteten minskar från 4°C och att antalet vätebindningar minskar kontinuerligt till kokpunkten.
  - kvarvarande vätebidningar (ca 50%) bryts då vattnet förångas.

- smältentropin är ovanligt låg för vatten därför att även flytande vatten är mycket vätebundet vilket ger färre frihetsgrader för varje vattenmolekyl (än för t.ex. en metanmolekyl i flytande metan).
4. (a) Avläsning i figuren ger  $\ln(k_2/T_2) = -14,72$  vid  $1/T_2 = 0,00275$  och  $\ln(k_1/T_1) = -19,66$  vid  $1/T_1 = 0,00309$ . Eyrings ekvation ger

$$\ln \frac{k_2 T_1}{k_1 T_2} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

vilket ger  $\Delta H^\ddagger = 120 \text{ kJ mol}^{-1}$ . För full poäng måste man ha mätt upp punkterna relativt noggrant (dvs med linjal). Om man mätt upp för onoggrant eller inte utnyttjade par av punkter som låg långt ifrån varandra (för att få en god bestämning av lutningen) gavs avdrag. Avdrag gavs även om svaret gavs med för många siffror (stor osäkerhet i mätningen). Det är fullt möjligt att mäta bättre än ca 1 mm fel på varje axel. Om man mäter inom  $\pm 1 \text{ mm}$  i alla mätningar hamnar  $\Delta H^\ddagger$  någonstans i intervallet 113 - 129 kJ/mol. Ett värde inom detta intervall med max tre siffror gav därför full poäng.

- (b) Logaritmering och derivering av Eyrings ekvation ( $k = \kappa k_B T/h \cdot e^{-\Delta H^\ddagger/RT} \cdot e^{\Delta S^\ddagger/R}$ ) ger

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T^2}$$

så att

$$E_a = RT^2 \cdot \frac{d \ln k}{dT} = RT + \Delta H^\ddagger$$

vilket ger  $E_a = 123 \text{ kJ mol}^{-1}$  vid den valda temperaturen. Det är alltså väldigt liten skillnad mellan  $E_a$  och  $\Delta H^\ddagger$  vilket gör att man experimentellt ofta sätter dem lika. I vårt fall är skillnaden ganska säkert lägre än felet man gör när man mäter upp punkterna i (a).

5.

$$Q = 1 + K_1[\text{Ca}^{2+}] + K_1 K_2 [\text{Ca}^{2+}]^2$$

$$v_{\text{Ca}^{2+}} = \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{Q} \cdot \frac{dQ}{d[\text{Ca}^{2+}]} = \frac{K_1[\text{Ca}^{2+}] + 2K_1 K_2 [\text{Ca}^{2+}]^2}{1 + K_1[\text{Ca}^{2+}] + K_1 K_2 [\text{Ca}^{2+}]^2} = 1,17$$

vid  $[\text{Ca}^{2+}] = 0,5 \mu\text{M}$ . Andelarna fritt respektive bundet till ligand är

$$p_P = \frac{1}{Q} = 0,28$$

$$p_{\text{PCa}} = \frac{K_1[\text{Ca}^{2+}]}{Q} = 0,28$$

$$p_{\text{PCa}_2} = \frac{K_1 K_2 [\text{Ca}^{2+}]^2}{Q} = 0,44$$

6. (a)  $k_a = 4\pi Da = 1,13 \cdot 10^{-17} \text{ s}^{-1} = 6,82 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (där enhetsomvandlingen görs genom multiplikation med  $1000N_A$ ).
- (b) Eftersom värdet i (a) är större än det experimentella värdet är  $k_a$  knappast diffusionsbegränsad.
7. (a) Proteinets laddning är  $-7e$ . Om all denna laddning betraktas som placerad i proteinets mitt ger lösningen till den linjära Poisson-Boltzmannekvationen (med Debyelängden  $7,86 \text{ \AA}$ ) att  $\psi_a = -23,9 \text{ mV}$  ( $a = 17 \text{ \AA}$ ).
- (b) På avståndet  $6 \text{ \AA}$  från ytan (dvs  $r = 23 \text{ \AA}$ ) ger lösningen till LPB  $\psi = -8,2 \text{ mV}$ .
8. (a)
- (b) Eftersom  $K = [\text{PCa}]/([\text{Ca}^{2+}][\text{P}])$  ger Nernst ekvation att  $\Delta\psi = -RT/(2F) \cdot \ln \frac{K(150 \text{ mM})}{K(0 \text{ mM})} = 56 \text{ mV}$ . Eftersom potentialen är negativ betyder "lägre" i frågeformuleringen egentligen "närmare noll", alltså  $|\psi(150 \text{ mM})| < |\psi(0 \text{ mM})|$ .
- Om man uppskattar skillnaden i elektrisk potential teoretiskt med hjälp av lösningen vid LPB vid ytan av en laddad sfär fås  $52 \text{ mV}$ , dvs god samstämmighet med experiment. Den student som gjorde detta istället för att använda Nernst fick i stort sett full poäng (eftersom det visar god förståelse, även om det inte egentligen svarar på frågan som ställdes).
- 9.
10. (a) Vi har två reaktionsvägar för att nå samma sluttillstånd, vilket ger två  $Q$ . Tänk på att  $c_P = [\text{P}] + [\text{P}_I\text{Ca}] + [\text{P}_{II}\text{Ca}] + [\text{PCa}_2]$  och att vi har två olika jämvikter som ger  $\text{PCa}_2$ ,  $[\text{PCa}_2] = K_{II,I}[\text{P}_I\text{Ca}][\text{Ca}^{2+}]$  och  $[\text{PCa}_2] = K_{I,II}[\text{P}_{II}\text{Ca}][\text{Ca}^{2+}]$ , vilket ger två  $Q$  som bägge måste vara lika:

$$Q = 1 + K_I[\text{Ca}^{2+}] + K_{II}[\text{Ca}^{2+}] + K_I K_{II,I}[\text{Ca}^{2+}]^2$$

och

$$Q = 1 + K_I[\text{Ca}^{2+}] + K_{II}[\text{Ca}^{2+}] + K_{II} K_{I,II}[\text{Ca}^{2+}]^2$$

Eftersom termen för  $[\text{Ca}^{2+}]$  måste vara lika oavsett hur vi skrivit upp problemet ger jämförelse med uppgift 5 att  $K_I + K_{II} = K_I$  (för bägge polynomen) medan jämförelse med  $[\text{Ca}^{2+}]^2$ -termerna ger  $K_I K_2 = K_I K_{II,I} = K_{II} K_{I,II}$

- (b) Om  $K_I = K_{II}$  har vi enligt den första visade likheten att  $K_I = K_{II} = K_I/2$ . Insättning i sambandet vi vill visa ger

$$\frac{K_{I,II}}{K_I} = \frac{2K_{I,II}}{K_I} = \frac{2K_I K_2}{K_I K_{II}} = \frac{4K_I K_2}{K_I^2} = \frac{4K_2}{K_I} > 1$$

vilket är uppfyllt om  $K_2 > K_I/4$ . Alltså visar data i tabellen ovan att calbindin binder kalcium kooperativt vid bägge salthalterna.

*Utvikning:* En närmare analys visar att villkoret  $K_I = K_{II}$  är onödigt strikt (även om det faktiskt gäller för calbindin). Låt oss anta att säte I och II har olika affinitet för calcium, dvs närmare bestämt att  $K_I$  och  $K_{II}$  skiljer sig åt med en faktor  $a$  (som kan vara både större och mindre än ett, beroende på vilket säte som binder bäst). Alltså har vi  $K_{II} = aK_I$  (och  $K_I = K_{II}/a$ ). Vi får

$$K_1 = K_I + aK_I = K_I \cdot (1 + a)$$

och

$$K_1 = \frac{K_{II}}{a} + K_{II} = K_{II} \cdot \left(1 + \frac{1}{a}\right)$$

Upprepning av ovanstående räkning ger

$$\begin{aligned} \frac{K_{I,II}}{K_I} &= \frac{(1+a)K_{I,II}}{K_1} = \frac{(1+a)K_1K_2}{K_1K_{II}} = \frac{(1+a) \cdot \left(1 + \frac{1}{a}\right) K_1K_2}{K_1^2} \\ &= (1+a) \cdot \left(1 + \frac{1}{a}\right) \cdot \frac{K_2}{K_1} = \left(2 + \frac{1}{a} + a\right) \cdot \frac{K_2}{K_1} \\ &= \left(4 + \frac{1+a^2-2a}{a}\right) \cdot \frac{K_2}{K_1} = \left(4 + \frac{(a-1)^2}{a}\right) \cdot \frac{K_2}{K_1} > 1 \end{aligned}$$

Eftersom termen  $(a-1)^2/a \geq 0$  för positiva  $a$  har vi nu visat att kooperativiteten är minst  $K_{I,II}/K_I = 4K_2/K_1$  men att den kan vara större om  $a$  avviker från 1. Eller, uttryckt annorlunda, om  $K_2 > K_1 / \left(4 + \frac{(a-1)^2}{a}\right)$  så är inbindningen kooperativ men det räcker att finna  $K_2 > K_1/4$  för att garantera kooperativitet.