

ИЗУЧЕНИЕ НЕОБРАТИМОЙ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

© 2000 г. А. Е. ЛЮБАРЕВ, Б. И. КУРГАНОВ

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Обратимая и необратимая денатурация белков. III. Модель одностадийной необратимой денатурации. IV. Отклонения от одностадийной модели. V. Модель Ламри–Эйринга и другие двухстадийные модели. VI. Более сложные модели. VII. Использование повторного сканирования для анализа калориметрических кривых сложной формы. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Проблема денатурации белка имеет большое значение как для фундаментальной, так и для прикладной науки. Изучение процесса денатурации позволяет установить связь между структурой белка и его стабильностью и понять, какие факторы определяют стабильность нативной конформации молекулы белка. Считается, что изучение механизмов денатурации (разворачивания) белковых молекул представляет также интерес с точки зрения выяснения механизмов фолдинга (сворачивания) белка [9, 41, 42].

Важность изучения денатурации белка с точки зрения биотехнологии связана с необходимостью повышения стабильности биокатализаторов, используемых в биотехнологических процессах, и с потребностью проводить эти процессы при более высоких температурах [35]. Медицинское значение проблемы денатурации и фолдинга белков выросло в последнее время в связи с установлением того факта, что причиной ряда смертельно опасных болезней человека и животных является агрегация белка, которая, в свою очередь, обусловлена неправильным фолдингом либо дестабилизацией белковых молекул [99, 106].

Одним из основных методов изучения тепловой денатурации белков является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Калориметрия – единственный метод, позволяющий прямо

измерять термодинамические характеристики белков и других веществ и тем самым изучать энергетику процессов, связанных с конформационными превращениями белковых молекул. Принципу метода ДСК и его применению для изучения биохимических объектов посвящен ряд обзоров [26, 76, 77, 83, 90, 95].

Совершенствование калориметрической техники позволило получать более точные данные по тепловой денатурации белков. Так, в ряде работ отмечалось, что при использовании одних калориметров кривые ДСК содержали экзотермический (отрицательный) пик, которого не было на кривых, полученных в тех же условиях для тех же белков, но с использованием более совершенных калориметров [24, 58, 63].

Следует отметить, что в развитии калориметрической техники большую роль сыграли работы отечественных ученых и приборостроителей. Разработанные в Пушкино дифференциальные сканирующие микрокалориметры ДАСМ–1М и ДАСМ–4 широко используются во многих странах (см., например, работы [15, 22, 38, 58, 61, 84, 103]).

Однако, для получения наиболее полной информации о тепловой денатурации белков, помимо создания точных калориметров, требуется также разработка математических методов анализа кривых ДСК. Так, для белков, денатурирующих обратимо и в равновесных условиях, были разработаны методы, позволяющие определить, в одну или в несколько стадий происходит разворачивание, найти термодинамические параметры процесса, а также расшифровать доменную структуру белковых молекул (см. обзоры [7, 57, 73–75, 77, 83, 95]). В то же время для белков, денатурация которых проходит необратимо, математические методы анализа кривых ДСК начали разрабатываться лишь около десяти лет назад. К настоящему времени развитие получила лишь одностадийная необратимая модель, то есть модель, включающая одну необратимую стадию¹. Тем не менее, становится ясно, что данная модель не в состоянии описать большинство случаев необратимой денатурации белка, и требуется разработка более сложных моделей. Такая работа в настоящее время ведется несколькими группами исследователей.

В данном обзоре обсуждаются известные из литературы данные ДСК для необратимо денатурирующих белков и их анализ в соответствии с моделями необратимой денатурации.

¹ В англоязычной литературе данную модель (как и одностадийную обратимую модель) принято называть «моделью двух состояний» (two-state model).

II. ОБРАТИМАЯ И НЕОБРАТИМАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ

В 70–е и 80–е годы был накоплен большой опыт по анализу методами равновесной термодинамики данных ДСК для белков, денатурация которых в ходе калориметрического эксперимента происходит обратимо и в равновесных условиях (см. обзоры [73–75, 77, 83, 95]). Впоследствии, однако, стали появляться данные, свидетельствующие о необратимом характере тепловой денатурации ряда белков [24, 32, 40, 58, 80, 84, 85].

Для проверки обратимости денатурации обычно используется процедура повторного прогрева: образец охлаждается, после чего заново снимается зависимость теплоемкости от температуры. Если при этом полностью воспроизводится исходная кривая, очевидно, что денатурация обратима. Если при повторном сканировании не наблюдается поглощения тепла (кривая воспроизводит базовую линию), делается вывод о необратимом характере денатурации.

В ряде случаев при повторном прогреве получаются кривые, отличающиеся от исходных меньшей величиной максимума избыточной теплоемкости и, соответственно, меньшим значением калориметрической энтальпии. В этих случаях часто делается вывод о частичной обратимости процесса и указывается процент обратимости [5, 28, 56, 60, 71]. Следует, однако, иметь в виду, что величина процента обратимости зависит от ряда факторов: температуры, до которой образец нагревался в первом эксперименте, скорости сканирования, скорости (режима) охлаждения. Последний фактор обычно наименее определен, так как в большинстве микрокалориметров охлаждение происходит с переменной скоростью.

К сожалению, в литературе практически нет экспериментальных работ, в которых бы исследовалась зависимость степени обратимости от перечисленных выше факторов. В работе Протасевич и соавт. [78] отмечалось, что степень обратимости тепловой денатурации апокальмодулина зависела от температуры, до которой образец нагревался в первом эксперименте: если прогрев останавливался немедленно после того, как заканчивался пик теплопоглощения, степень обратимости была не менее 95%. Следует отметить также работу Гойнса и Фрейра [32], в которой для пентамерной формы субъединицы В токсина холеры была проведена серия последовательных прогревов. Авторы данной работы обнаружили, что степень обратимости убывает по экспоненциальному закону в зависимости от времени пребывания образца при температурах выше «температуры перехода», но они не привели детального описания эксперимента.

В работе Потехина и Ковригина [6] теоретически исследовалась обратимая одностадийная денатурация в неравновесных условиях. Показано, что при высоких скоростях охлаждения большая часть белка не успевает вернуться в нативное состояние. Таким образом, принципиально обратимая система при быстром охлаждении может вести себя как частично (или даже полностью) необратимая. Авторы сделали вывод, что во многих случаях необратимость в калориметрических экспериментах является следствием низкой скорости ренатурации белка.

Большинство исследователей видит причину необратимости процесса денатурации в том, что вслед за обратимой стадией разворачивания (unfolding) следует стадия, в ходе которой молекула белка подвергается необратимым изменениям [14, 22–24, 51, 58, 63, 64, 68, 84, 87, 93, 100, 103]. Наиболее простой схемой для описания такого процесса является модель Ламри–Эйринга [53], включающая последовательно протекающие обратимую и необратимую стадии:



где N, U и D – нативное, частично развернутое и денатурированное состояния белка, k_1 , k_{-1} и k_2 – константы скорости соответствующих реакций.

Согласно данным Клибанова и сотр. [44, 104, 107] причиной необратимых изменений могут быть агрегация, автолиз, химическая модификация аминокислотных остатков и др.

Модель одностадийной обратимой денатурации можно рассматривать как частный случай модели Ламри–Эйринга. Если в интервале температур, в котором происходит разворачивание, скорость второй стадии мала по сравнению со скоростью разворачивания, форма N трансформируется в форму U без заметного превращения последней в форму D. Вторая стадия происходит в интервале температур, где разворачивание практически закончилось. Если при этом вторая стадия не сопровождается заметным тепловым эффектом, кривая ДСК практически не отличается от кривой, описываемой одностадийной обратимой моделью [3, 50, 82].

Если скорость второй стадии велика, модель Ламри–Эйринга может быть сведена к одностадийной необратимой модели [3, 50, 82]:



В работе Санчез–Руиза [82] рассмотрено две ситуации, когда это возможно. В первой ситуации значение константы k_2 значительно превышает значения констант k_1 и k_{-1} , так что прямая

реакция первой стадии является скорость—лимитирующей, а обратная реакция практически отсутствует (ситуация С' согласно [82]). В этом случае константа k из модели (2) эквивалентна k_1 из модели (1).

Вторая ситуация реализуется, когда скорости прямой и обратной реакций первой стадии велики по сравнению со скоростью второй стадии, но равновесие на первой стадии сдвинуто в сторону образования формы N (константа равновесия $K = k_1/k_{-1} \ll 1$). В этом случае константа k из модели (2) эквивалентна k_2K (ситуация С согласно [82]).

В ряде работ предпринималась попытка описать методами равновесной термодинамики кривые ДСК, несмотря на то, что денатурация была калориметрически необратимой (отсутствовало теплопоглощение при повторном прогреве) [16, 24, 40, 58, 61, 80, 94, 96, 97]. При этом предполагалось, что процесс денатурации подчиняется модели Ламри—Эйринга, но необратимая стадия происходит в интервале температур, где разворачивание практически закончилось (см., например, [24, 58]). Впоследствии Санчез—Руиз [82] показал, что данные, описанные в работе [58] методами равновесной термодинамики, гораздо лучше могут быть описаны в рамках модели Ламри—Эйринга.

Ле Бихан и Жико [48] показали, что данные ДСК для G—актина, полученные в нескольких работах и интерпретированные в этих работах в рамках равновесно—термодинамического подхода, соответствуют уравнению, полученному для необратимой одностадийной модели (см. уравнение (10) в следующем разделе).

При обсуждении вопроса о причинах необратимости денатурации белков необходимо иметь, как уже отмечалось выше, более подробные данные о повторном прогреве. Обычно для того, чтобы можно было корректно вычесть базовую линию, первый прогрев проводят до температуры, существенно превышающей температуру, при которой заканчивается пик теплопоглощения. Если после этого оказывается, что денатурация необратима, необратимость может быть приписана действию температур, более высоких, чем температуры, при которых происходит разворачивание молекулы белка. Для проверки этого предположения необходимо в последующих экспериментах останавливать прогрев в момент завершения пика теплопоглощения или раньше, затем охлаждать и проводить повторный прогрев. Так, в работе [55] для случая тепловой денатурации креатинкиназы нами было показано, что, если остановить прогрев в момент завершения пика теплопоглощения, при повторном прогреве теплопоглощения не наблюдается. Более того, если остановить

прогрев немного не доходя до положения максимума, то при повторном прогреве воспроизводится лишь 25% теплопоглощения от исходного прогрева. Такие результаты позволяют сделать однозначный вывод о том, что необратимость проявляется уже в ходе самого процесса разворачивания молекулы белка.

Чтобы проверить, проходит ли процесс денатурации в равновесных или неравновесных условиях, необходимо использовать несколько скоростей прогрева (сканирования). В серии работ Санчес—Руиза и соавт. [21, 22, 28–30, 36, 84, 85] было показано, что для ряда белков скорость сканирования существенно влияет на положение максимума на кривых ДСК. Это означает, что процесс денатурации в данном случае находится под кинетическим контролем. Впоследствии аналогичные результаты были получены и для многих других белков (см. следующий раздел).

III. МОДЕЛЬ ОДНОСТАДИЙНОЙ НЕОБРАТИМОЙ ДЕНАТУРАЦИИ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Теоретический анализ зависимости избыточной теплоемкости от температуры в рамках модели (2) был проведен в ряде работ [21, 22, 26, 46, 83, 84]. Предполагается, что константа скорости k подчиняется уравнению Аррениуса:

$$k = A \exp(-E_a/RT), \quad (3)$$

где A – предэкспоненциальный множитель, E_a – энергия активации, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура. Удобнее записывать уравнение Аррениуса в другой форме [21, 46, 82]:

$$k = \exp\{(E_a/R)(1/T^* - 1/T)\}, \quad (4)$$

где T^* – абсолютная температура, при которой $k = 1 \text{ мин}^{-1}$. Кроме того, используется допущение, что параметры уравнения Аррениуса E_a и T^* , а также энтальпия денатурации ΔH не зависят от температуры.

Кинетическое поведение системы, удовлетворяющей данной модели, при постоянной скорости изменения температуры (скорости сканирования) $v = dT/dt$ (t – время) описывается дифференциальным уравнением:

$$d\gamma_N/dT = -(1/v)k\gamma_N, \quad (5)$$

где γ_N – доля молекул белка, находящихся в нативной форме. Решение данного уравнения может быть получено в виде выражения:

$$\gamma_N = \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \exp \left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] dT \right\}. \quad (6)$$

Интеграл в уравнении (6) не имеет аналитического решения и должен вычисляться с помощью численных методов.

Текущее количество теплоты (Q), поглощаемое в процессе денатурации, может быть определено из уравнения:

$$Q = (1 - \gamma_N) \Delta H, \quad (7)$$

а избыточная теплоемкость (C_p^{ex}) – из уравнения:

$$C_p^{ex} = dQ/dT = k \gamma_N \Delta H/v. \quad (8)$$

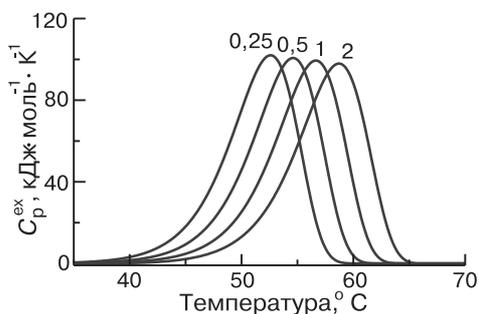
Из уравнений (6)–(8) можно получить следующее выражение для избыточной теплоемкости [46]:

$$C_p^{ex} = \frac{1}{v} \Delta H \exp \left\{ \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right\} \times \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \exp \left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] dT \right\}. \quad (9)$$

Зависимость избыточной теплоемкости от температуры имеет форму кривой с максимумом (см. рис. 1). Пик обладает ярко выраженной асимметрией. Оказалось, что степень асимметрии пика (отношение площадей левой и правой частей пика) практически не зависит от параметров модели и приблизительно равно $e-1$, т.е. $\sim 1,72$ [2, 6].

Рис. 1. Теоретические зависимости избыточной теплоемкости от температуры, построенные на основании уравнения (9) [26].

$\Delta H = 800$ кДж/моль, $E_a = 300$ кДж/моль, $\ln A = 108,3$ ($T^* = 333,2$ К). Значения скорости сканирования приведены над кривыми.



Как видно из уравнения (9), зависимость избыточной теплоемкости от температуры определяется скоростью сканирования, энтальпией денатурации и двумя параметрами уравнения Аррениуса. При этом энтальпия денатурации не влияет на форму кривой, а играет роль масштабного коэффициента. Энергия активации определяет в первую очередь ширину пика (чем больше энергия активации, тем уже пик), в то время как положение максимума зависит, главным образом, от значений параметра T^* и скорости сканирования.

Санчез—Руиз и соавт. [84] получили следующее выражение, связывающее положение максимума (T_m) с параметрами модели:

$$v/T_m^2 = (AR/E_a) \exp(-E_a/RT_m). \quad (10)$$

Преобразовав данное уравнение, получаем:

$$T_m = \frac{T^*}{1 - \frac{T^*}{E_a/R} \ln(E_a/R) + \ln v - 2 \ln T_m}. \quad (11)$$

Расчеты показывают, что значения знаменателя в уравнении (11) в интервале значений энергии активации 200÷500 кДж/моль, параметра T^* 323÷353 К и скорости сканирования 0,1÷2 К/мин составляют 1÷1,05. Увеличение скорости сканирования в α раз приводит к сдвигу положения максимума в сторону более высоких температур, который составляет

$$\Delta T_m = (0,9\div 1) \{ (T^*)^2 / (E_a/R) \} \ln \alpha \quad (12)$$

градусов. Так, при $E_a = 300$ кДж/моль и $T^* = 333,16$ К увеличение скорости сканирования в 2 раза приводит к сдвигу примерно на 2 градуса.

Санчез—Руиз и соавт. [84] получили также приближенное уравнение, связывающее положение максимума (T_m) с максимальным значением избыточной теплоемкости ($C_{p, \max}^{\text{ex}}$):

$$E_a = eRC_{p, \max}^{\text{ex}} T_m^2 / \Delta H. \quad (13)$$

Из этого уравнения следует, что сдвиг положения максимума в сторону более высоких температур, связанный с увеличением скорости сканирования, должен сопровождаться небольшим снижением максимального значения избыточной теплоемкости (примерно на 1% при сдвиге на 2 градуса).

МЕТОДЫ РАСЧЕТА ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ
ИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КРИВЫХ

Энтальпия денатурации может быть легко вычислена как площадь под кривой зависимости избыточной теплоемкости от температуры. Для определения параметров уравнения Аррениуса из экспериментальных кривых, удовлетворяющих одностадийной необратимой модели, требуется более сложная процедура.

Санчез–Руиз и соавт. [84] предложили 4 способа расчета энергии активации.

1. Значение энергии активации может быть получено для каждой кривой прямым вычислением по формуле (13), исходя из максимального значения избыточной теплоемкости и значения температуры, при которой избыточная теплоемкость достигает максимума.

2. Зная значения T_m , полученные при разных скоростях сканирования, можно, в соответствии с уравнением (10), определить отношение E_a/R как тангенс угла наклона зависимости $\ln(v/T_m^2)$ от $1/T_m$.

3. Санчез–Руиз и соавт. получили следующее выражение для константы скорости:

$$k = v C_p^{\text{ex}} (\Delta H - Q). \quad (14)$$

Учитывая уравнения (3) и (14), отношение E_a/R может быть определено как тангенс угла наклона зависимости $\ln[v C_p^{\text{ex}}/(\Delta H - Q)]$ от $1/T$.

4. Санчез–Руиз и соавт. получили приближенное выражение, связывающее величину Q с температурой:

$$\ln\{\ln[\Delta H/(\Delta H - Q)]\} = E_a/R(1/T_m - 1/T). \quad (15)$$

С учетом этого уравнения отношение E_a/R может быть определено для каждой кривой как тангенс угла наклона зависимости $\ln\{\ln[\Delta H/(\Delta H - Q)]\}$ от $1/T$.

Позже было получено приближенное уравнение зависимости избыточной теплоемкости от температуры:

$$C_p^{\text{ex}} = e C_{p, \text{max}}^{\text{ex}} \exp[E_a(T - T_m)/(RT_m^2)] \times \\ \times \exp\{-\exp[E_a(T - T_m)/(RT_m^2)]\}, \quad (16)$$

и был предложен пятый способ, основанный на приближении данного уравнения к экспериментальной кривой с помощью нелинейного метода наименьших квадратов [21, 22]¹.

¹ В работе [21] использовался другой вариант уравнения (16), где вместо $e C_{p, \text{max}}^{\text{ex}}$ было записано $\Delta H E_a/(RT_m^2)$. Этот же вариант приводится в обзоре [83].

Большинство из перечисленных способов обладают существенными недостатками. Способы 1 и 2 используют лишь одну точку из каждой экспериментальной кривой, что снижает надежность получаемых результатов. Способы 4 и 5 основаны на приближенных уравнениях, которые соответствуют модели лишь вблизи положения максимума, поэтому они плохо описывают начальный и конечный участки кривой. Кроме того, способы 1, 2, 4 и 5 позволяют определить лишь один из параметров уравнения Аррениуса (энергию активации), в то время как значение другого параметра (A или T^*) с помощью данных способов определить не удастся.

Наиболее ценным из перечисленных способов является способ 3, основанный на использовании уравнений (3) и (14). Одно из преимуществ этого способа состоит в том, что значение $\ln[v C_p^{\text{ex}}/(\Delta H - Q)]$ в случае выполнимости одностадийной модели не должно зависеть от скорости сканирования. Поэтому точки, полученные при разных скоростях сканирования, должны лежать на одной прямой. Таким образом, данный способ позволяет одновременно использовать все экспериментальные данные.

Другое достоинство данного способа – возможность вычисления не только энергии активации, но и второго параметра уравнения Аррениуса. Натуральный логарифм предэкспоненциального множителя A может быть определен по пересечению графика $\{\ln[v C_p^{\text{ex}}/(\Delta H - Q)]; 1/T\}$ с осью ординат или методом линейной регрессии. Однако, более целесообразно использовать вместо A другой параметр (T^*) в соответствии с уравнением (4). В этом случае на основании уравнений (4) и (14) можно записать следующую зависимость:

$$1/T = 1/T^* - \ln[v C_p^{\text{ex}}/(\Delta H - Q)]/(E_a/R). \quad (17)$$

На основании данного уравнения $1/T^*$ и E_a/R могут быть определены методом линейной регрессии или из графика зависимости $1/T$ от $\ln[v C_p^{\text{ex}}/(\Delta H - Q)]$: E_a/R – как котангенс угла наклона прямой, а $1/T^*$ – как точка пересечения прямой с осью ординат. Значения энергии активации, определяемые на основании либо уравнения (17), либо уравнений (3) и (14) практически не отличаются друг от друга в пределах точности метода. Значения параметра T^* может быть определено на основании уравнения (17) с гораздо большей точностью, чем значение параметра A на основании уравнений (3) и (14). Кроме того, параметр T^* имеет более ясный физический смысл, чем параметр A .

Одним из недостатков данного способа является необходимость предварительного вычисления значений Q путем интегрирования зависимости C_p^{ex} от T до текущего значения температуры. В прин-

ципе, при наличии соответствующего программного обеспечения значения Q могут быть легко получены для большого числа экспериментальных точек. Однако, в большинстве работ, где применялся данный метод, использовалось весьма ограниченное число экспериментальных точек (5–7), что снижало точность расчета.

Следует также отметить, что сильные флуктуации значений избыточной теплоемкости в начальной и конечной части кривой (характерные для кривых ДСК) могут приводить к систематической ошибке при определении значений Q и ΔH и тем самым искажать результаты расчетов. Кроме того, незначительные колебания значений C_p^{ex} вблизи нулевого значения (в начальной и конечной части кривой) приводят к большим изменениям в значениях $\ln[vC_p^{\text{ex}}/(\Delta H - Q)]$, поэтому приходится ограничивать используемый интервал экспериментальных точек. Мы обычно используем все экспериментальные точки в интервале значений Q между 5 и 95% от ΔH .

Еще один недостаток метода связан с тем, что для поиска оптимальных значений параметров приходится минимизировать отклонения рассчитанных значений функции не от экспериментальной кривой, а от ее линейной анаморфозы. При этом небольшим отклонениям между экспериментальным и теоретическим значениями функции на линейном графике могут соответствовать заметные отклонения на графике зависимости C_p^{ex} от T , особенно вблизи положения максимума.

Последний недостаток может быть исправлен, если использовать аппроксимацию экспериментальных кривых уравнением

$$C_p^{\text{ex}} = (1/v)(\Delta H - Q)\exp\{(E_a/R)(1/T^* - 1/T)\} \quad (18)$$

с помощью нелинейного метода наименьших квадратов [46]. Кроме того, данный способ не чувствителен к флуктуациям в начальной и конечной части экспериментальной кривой. Однако, сохраняется недостаток, связанный с возможностью систематической ошибки при определении значений Q и ΔH . Следует отметить, что Q используется в уравнении (18) как независимая переменная, в то время как фактически ее значение рассчитывается, исходя из значений зависимой переменной C_p^{ex} . Кроме того, в данном случае ΔH не может быть использован как независимый параметр, поскольку используется разность $\Delta H - Q$.

В работе [46] дифференцированием зависимости $\ln C_p^{\text{ex}}$ от $1/T$ получено уравнение:

$$\begin{aligned} d(\ln C_p^{\text{ex}})/d(1/T) = (1/v)T^2 \exp\{(E_a/R)(1/T^* - 1/T)\} - \\ - E_a/R. \end{aligned} \quad (19)$$

В соответствии с данным уравнением параметры E_a и T^* могут быть определены нелинейным методом наименьших квадратов из зависимости $d(\ln C_p^{ex})/d(1/T)$ от $1/T$, которая может быть получена математической обработкой исходной кривой ДСК. Достоинством данного метода является отсутствие необходимости предварительного вычисления значений Q . Однако, данный метод чувствителен к флуктуациям в начальной и конечной части экспериментальной кривой.

Наиболее точным и удобным является, на наш взгляд, способ, основанный на аппроксимации экспериментальных кривых уравнением (9) с помощью нелинейного метода наименьших квадратов [46]. Этот способ практически не чувствителен к флуктуациям в начальной и конечной частях экспериментальной кривой. Вместо переменной Q , которая должна вычисляться интегрированием экспериментальной кривой, используется интеграл теоретической зависимости k от T , который (в отличие от Q) может быть вычислен с любой степенью точности. Нет необходимости также предварительно вычислять значение ΔH , поскольку оно может быть получено в результате аппроксимации вместе с параметрами E_a и T^* . Кроме того, все параметры в уравнении (9), кроме v , являются общими для всех экспериментальных кривых, поэтому данный способ позволяет проводить аппроксимацию одновременно нескольких экспериментальных кривых, полученных при разных скоростях сканирования [54, 55].

К недостаткам метода можно отнести то, что большинство широко используемых калориметристами программных продуктов (например, программный пакет Microcal Origin) не позволяет проводить аппроксимацию с помощью уравнений, содержащих интеграл. Нами была разработана специальная программа, позволяющая определять данным методом параметры одностадийной модели [46, 54].

Возможен и другой способ, который основан на аппроксимации экспериментальных данных непосредственно с помощью дифференциального уравнения (5) и уравнения (8). Этот способ использовался в некоторых работах [51, 55, 63]. Способ также требует сложного программного обеспечения.

В работах Майлса и соавт. [66, 67] одностадийная необратимая модель анализировалась в рамках предположения, что температурная зависимость константы скорости подчиняется не уравнению Аррениуса, а уравнению теории переходного состояния:

$$k = \frac{k_B T}{h} \Delta H \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right), \quad (20)$$

где k_B – постоянная Больцмана, h – постоянная Планка, ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger – энтропия и энтальпия переходного состояния. Авторы анализировали данные ДСК для коллагена с использованием как уравнения Аррениуса, так и уравнения (20) и пришли к выводу, что различия между двумя вариантами несущественны.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ, ОПИСАННЫЕ В РАМКАХ ОДНОСТАДИЙНОЙ НЕОБРАТИМОЙ МОДЕЛИ

В настоящее время известно более двух десятков белков, тепловая денатурация которых была описана в рамках одностадийной необратимой модели. Данные об этих белках и результаты расчета параметров процесса денатурации (изменения энтальпии и энергии активации) приведены в табл. 1. В табл. 2 приведены результаты расчета энергии активации, полученные разными методами.

К сожалению, в большинстве работ не приводятся результаты расчета второго параметра уравнения Аррениуса (A или T^*). Значения параметра T^* приведены только для карбоксипептидазы В в присутствии Zn^{2+} [21], аннексина V [103], ацетилхолинэстеразы и целлюлазы [46], лектина из чечевицы [46, 59], липазы В [88] и креатинкиназы [55]. Значения параметра A приведены для G-актина [48] и бромелаина [14].

Согласно Привалову [7], энтальпия денатурации определяется главным образом температурой и молекулярной массой белка. При 110 °С энтальпия денатурации большинства белков составляет примерно 6 кДж на моль аминокислотного остатка. При 50 °С энтальпия денатурации белков находится в пределах $1,5 \div 3$ кДж на моль аминокислотного остатка или $14 \div 28$ Дж/г, а при 75 °С – $31 \div 38$ Дж/г. В более позднем обзоре Махатадзе и Привалова [57] нижние пределы практически не изменились, а верхние пределы увеличились.

Однако, значения энтальпии денатурации, приведенные в табл. 1, в основном ниже данных Привалова или находятся в районе нижней границы. Большинство белков, представленных в таблице, можно разделить на две группы. В первой группе (в основном это белки, денатурация которых наблюдалась при температурах $40 \div 60$ °С) удельная энтальпия составляет $12 \div 15$ Дж/г, во второй (в основном это белки, денатурация которых наблюдалась при температурах $60 \div 80$ °С) – $18 \div 23$ Дж/г. Для термолизина и супероксиддисмутазы, денатурация которых наблюдалась при температурах $80 \div 100$ °С, удельная энтальпия составляет $35 \div 40$ Дж/г. Аномально низкое значение удельной энтальпии (7,5 Дж/г) получено для АТФ-синтазы.

Таблица 1
Белки, тепловая денатурация которых описана с помощью одностадийной необратимой модели

| Название белка | Источник | Мо- м. кДа | N ¹ | pH | Скорости ска- нирования | | ΔH , кДж/моль | E_a , кДж/моль | Используемые уравнения | Ссылка |
|---|---|------------------|----------------|-----|----------------------------|----------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|--------|
| | | | | | a ² | b ³ | | | | |
| G-актин | Мышцы кролика | 43 | 1 | 8,0 | 0,15-1,1 | 4 | 664 | 245±285 | 10, 14 | 48 |
| Аннексин V E17G | <i>E. coli</i> | 35,7 | 1 | 7,0 | 0,1-2,3 | 4 | 690 | 611±70 | 10, 13-15 | 103 |
| АТФсинтаза | <i>Bacillus PS3</i> | 550 | 13 | 8,0 | 0,8 | 1 | 4120 | 854±40 | 13-16 | 102 |
| АТФаза | Митохондрии сердца КРС ⁴ | 370 | 9 | 7,0 | 0,3 | 1 | 4600 | 530±20 | 13-16 | 101 |
| Комплексе F ₁ АТФазы | Хлоропласты | 400 | 9 | 7,5 | 0,75 | 1 | 3986 | 348 | ? | 105 |
| Ацетилхолинэстераза | <i>Torpedo californica</i> | 130 | 2 | 7,3 | 0,2-1,4 | 5 | 1603±100 | 548±33 | 10, 13-16 | 45 |
| Бромелаин | Стебель | 22,8 | 1 | 3,4 | 1 | 1 | 334±17 | 226±11 | 13 | 14 |
| Гемоцианин | Омар | 500 | 6 | 7,2 | 0,25-2 | 4 | 13700±1000 | 383±30 | 10, 13-15 | 36 |
| Глутаматдегидрогеназа | Печень КРС | 337 | 6 | 7,6 | 0,2-1,5 | 4 | 276 | 276 | 10 | 93 |
| Глутатионредуктаза | <i>Spirulina maxima</i> | 96 | 2 | 7,0 | 0,5-1,5 | 4 | 1000±1500 | 411 | 14 | 79 |
| 5-Еноилпируват-цикли- мат-3-фосфатасинтаза | <i>E. coli</i> | 46 | 7,0 | 7,0 | 0,1-0,75 | 4 | 1046±38 | 553±21 | 5 | 63 |
| Карбамойлфосфатасинтаза | То же | 159 | 2 | 7,5 | 0,5-2 | 3 | 2005 | 434 | ? | 18 |
| Карбоксипептидаза А | Полжелудочная железа свиньи | 34,8 | 1 | 7,5 | 0,5-2 | 3 | 696±905 | 250±14 | 10, 14, 15 | 85 |
| Карбоксипептидаза В | То же | 34,5 | 1 | 7,5 | 0,25-2 | 4 | 625±758 | 270±4 | 10, 13-16 | 22 |
| Прокарбоксипептидаза А | То же | 46,4 | 1 | 7,5 | 0,5-2 | 3 | 835±974 | 300±20 | 10, 14, 15 | 85 |
| Прокарбоксипептидаза В | То же | 45,5 | 1 | 7,5 | 0,25-2 | 4 | 786±912 | 342±12 | 10, 13-16 | 22 |
| Креатинкиназа | Мышцы кролика | 84 | 2 | 8,0 | 0,1-1 | 4 | 1079 | 461 | 9, 5 | 55 |
| Лактатдегидрогеназа | Мышцы свиньи | 134 | 4 | 7,0 | 1 | 1 | 1763 | 172 | 13 | 8 |
| Лектин В | Чечевица | 48 | 4 | 7,4 | 0,2-1,5 | 4 | 812±1056 | 345±376 | 9, 10, 13-16 | 59, 87 |
| Супероксиддисмутаза | Эритроциты КРС | 60 | 1 | 7,2 | 0,2-1,5 | 4 | 996±1248 | 239±275 | 9 | 88 |
| Термолизин | <i>Candida rugosa</i> | 32 | 2 | 7,0 | 0,3-1 | 4 | 1128±1459 | 240 | 10 | 34 |
| Транспортер глюкозы GLUT1 | <i>Bacillus thermoproteolyticus rokko</i> | 37,5 | 1 | 7,5 | 0,2-1,9 | 4 | 1336±50 | 282±8 | 10, 13-15 | 84 |
| Целлюлаза | Эритроциты человека | 53 | 1 | 7,4 | 0,25-1,5 | 4 | 624±130 | 582±63 | ? | 25 |
| Цитотоксин RTX-8 | <i>Streptomyces halstedii</i> JM8 | 28 | 1 | 6,0 | 0,2-1,5 | 4 | 348 | 553±590 | 10, 13-16 | 31 |
| Стр3А-эндотоксин | <i>Radianthus macrodactylus</i> | 8 | 1 | 7,4 | 0,25-2 | 4 | 945±1300 | 189±210 | 10, 13-15 | 109 |
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 67 | 1 | 3,0 | 0,125-2 | 4 | 945±1300 | 389±410 | 16 | 72 |

¹ Число субъединиц; ² интервал скоростей сканирования, град/мин; ³ число скоростей сканирования; ⁴ крупный ротатый скот.

Таблица 2
Значения энергии активации одностадийной денатурации,
определенные разными способами

| Белок | рН | Скорости сканирования | | Энергия активации, определенная способом, основанным на уравнении | | | | | Ссылка |
|--|-----|-----------------------|----------------|---|--------|--------|---------|---------|--------|
| | | a ¹ | b ² | 14 | 15 | 10 | 13 | 16 | |
| G-актин | 8,0 | 0,15–1,1 | 4 | 285±2 ³ | | 245±5 | | | 48 |
| Аннексин VE17G | 7,0 | 0,1–2,3 | 4 | 601±35 | 546±50 | 713±95 | 586±120 | | 103 |
| Ацетилхолинэстераза | 7,3 | 0,2–1,4 | 5 | 540±33 | 578±42 | 494±42 | 561±25 | 536±594 | 45 |
| Бактериородопсин, обработанный NaBH ₄ | 9,5 | 0,5–2 | 3 | 373±34 | 392±60 | 336±13 | 387±49 | 382±48 | 15 |
| Гемоцианин | 7,2 | 0,25–2 | 4 | 390 | 420 | 350 | 370 | | 36 |
| 5-Еноилпируват-ши-кимат-3-фосфатсинтаза | 7,0 | 0,1–0,75 | 4 | 548±13 | | 540±21 | | | 63 |
| Карбоксипептидаза В ⁴ | 9,0 | 0,5–2 | 3 | 262±8 | | 286±4 | 270±5 | 267±5 | 21 |
| Лектин ⁵ | 7,4 | 0,2–1,5 | 4 | 360±16 | 360±14 | 346±18 | 368±16 | 376±14 | 87 |
| Лизоцим в присутствии хлорбутанола | 4,5 | 0,3–1 | 4 | 104±6 | 101±7 | 110±4 | 108±6 | | 43 |
| Термолизин | 7,5 | 0,2–1,9 | 4 | 275±5 | 296±14 | 269±5 | 287±9 | | 84 |
| Целлюлаза | 6,0 | 0,2–1,5 | 4 | 557±17 | 553±13 | 578±13 | 590±33 | 590±21 | 31 |
| Цитотоксин RTX-8 | 7,4 | 0,25–2 | 4 | 192±9 | 210±8 | 202±6 | 189±8 | | 109 |

¹ Интервал скоростей сканирования, град/мин.

² Число скоростей сканирования.

³ Рассчитано для скорости сканирования 0,625 град/мин.

⁴ В присутствии 0,26 мМ Zn²⁺.

⁵ В статье приведены вдвое меньшие значения энергии активации, т.к. они рассчитывались на димер, а не тетрамер.

Разброс значений удельной энергии активации получился гораздо сильнее, чем разброс значений энтальпии денатурации. Для высокомолекулярных белков значения удельной энергии активации оказываются наиболее низкими: 0,8÷0,9 Дж/г для гемоцианина, глутаматдегидрогеназы и комплекса F₁; 1,3÷1,6 Дж/г для лактатдегидрогеназы, АТФазы и АТФ-синтазы. Для группы белков с молекулярной массой 32÷48 кДа (термолизин, карбоксипептидаза А, прокариотическая карбоксипептидаза В, супероксиддисмутаза и лектин из чечевицы) значения удельной энергии активации составили 7÷8 Дж/г. Максимальное значение удельной энергии активации получено для наименьшего из приведенных в таблице белков, цитотоксина RTX-8 – 24,8 Дж/г.

Таким образом, мы видим общую тенденцию к снижению значений удельной энергии активации с увеличением молекулярной массы белка. Трудно сказать, имеет ли данная тенденция физический смысл. Не следует забывать, что мы имеем дело с кажущимися значениями энергии активации. Ни для одного из приведенных в табл. 1 белков нет строгих доказательств того, что процесс денатурации проходит в одну стадию. Более того, для некоторых белков очевидно, что это не так (см. раздел IV). Приведенные в таблице кажущиеся значения могут существенно отличаться от истинных значений энергии активации для стадии разворачивания белковой молекулы. Вероятно, с увеличением размера белка увеличивается число стадий денатурации, либо увеличивается скорость стадий, следующих за разворачиванием, что приводит к уменьшению кажущегося значения энергии активации.

Следует обратить внимание на тот факт, что для большинства белков, данные о которых приведены в табл. 1, значения энтальпии денатурации оказались больше значений энергии активации. Если предполагать, что процесс денатурации носит истинно одностадийный характер, такое соотношение означает, что энергия активации обратного процесса должна быть отрицательной, т.е. константа скорости ренатурации должна уменьшаться с ростом температуры. Такая возможность обсуждается в работе [6]. Тем не менее более правдоподобным нам представляется предположение о том, что денатурация описанных белков имеет многостадийный характер, а рассчитанные значения энергии активации характеризуют одну из начальных стадий процесса, которая является скоростью—лимитирующей.

ОПИСАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ОДНОСТАДИЙНОЙ МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ ДРУГИМИ МЕТОДАМИ

В ряде работ для изучения тепловой денатурации белка использовались, помимо ДСК, другие методы. Так, за ходом денатурации белка можно следить методами флуоресценции или КД. Если процесс денатурации при постоянной температуре описывается кинетическим уравнением первого порядка, то из получаемых для каждой температуры значений константы скорости k на основании уравнения Аррениуса (уравнение (3) или (4)) можно вычислить значения энергии активации E_a и параметра A или T^* .

Определенные таким образом значения энергии активации отличались от значений энергии активации, определенной из анализа кривых ДСК, на 20% для G-актина [48] и бромелаина [14]. Для целлюлазы [31], лектина из чечевицы [87], и липазы В [88]

значения E_a , определенные методами ДСК и изотермической денатурации, совпадали в пределах экспериментальной ошибки.

Аналогичным образом значения параметров уравнения Аррениуса могут быть получены из данных по изотермической инактивации. Строго говоря, инактивация фермента и его денатурация (разворачивание) являются разными процессами. Согласно данным Цоу [10, 110], инактивация предшествует разворачиванию белковой глобулы, поэтому результаты, полученные методами инактивации и ДСК, не обязательно должны совпадать. Тем не менее в ряде работ было показано совпадение (в пределах экспериментальной ошибки) значений E_a , полученных этими методами. Так, для ацетилхолинэстеразы [45], целлюлазы [31], АТФ-синтазы [102] и комплекса F_1 АТФазы хлоропластов [105] значения энергии активации, определенные из анализа кинетики инактивации, отличались от значений энергии активации, определенных из анализа кривых ДСК, не более чем на 8%.

Ряд физических методов позволяет получать интегральные кривые денатурации, т.е. зависимости доли денатурированного белка от температуры. Например, изменяя температуру с постоянной скоростью, можно непрерывно следить за изменением конформационного состояния белка методами флуоресценции или КД.

Для анализа подобных кривых Фуджита и соавт. [27] предложили методы оценки параметров уравнения Аррениуса с помощью приближенных уравнений:

$$T_{1/2} = T^* + \frac{R(T^*)^2}{E_a} \ln \left\{ \frac{E_a v \ln 2}{R(T^*)^2} \right\} \quad (21)$$

и

$$\ln \left(-\frac{\ln \gamma_N}{\ln 2} \right) = \frac{E_a}{R(T^*)^2} (T - T_{1/2}), \quad (22)$$

где $T_{1/2}$ — температура, при которой денатурирует половина молекул белка (определяется из интегральной кривой). Уравнение (21) позволяет из линейной зависимости $T_{1/2}$ от $\ln v$ найти отношение $R(T^*)^2/E_a$, а затем параметры E_a и T^* . Уравнение (22) позволяет найти отношение $R(T^*)^2/E_a$ из линейной зависимости $\ln(-\ln \gamma_N / \ln 2)$ от $(T - T_{1/2})$, а затем параметры уравнения Аррениуса из уравнения (21). Данные способы не нашли широкого применения. Фуджита с соавт. [27] получили для термолизина при рН 8,2 значение энергии активации 340 кДж/моль, которое на 3% отличается от значения, полученного впоследствии методом ДСК при тех же условиях [84].

Руиз—Санз с соавт. [81] анализировали интегральные кривые, полученные для трех фракций миелиновых белков методом термогелевого анализа (thermal gel analysis) с помощью уравнения, аналогичного уравнению (16) для дифференциальных кривых:

$$\gamma_N = \exp\{-\exp[E_a(T - T_m)/(RT_m^2)]\}. \quad (23)$$

Морин с соавт. [68] предложили анализировать интегральные кривые с помощью уравнения (6), используя нелинейный метод наименьших квадратов. Данным способом из экспериментальных данных по термогелевому анализу цитохромоксидазы, реконструированной в липосомы, были получены значения параметров уравнения Аррениуса для разных субъединиц фермента [68].

Способ, основанный на уравнении (6), использовался также для анализа данных по инактивации липазы В [88] и по денатурации лектина из чечевицы на основе данных инфракрасной спектроскопии [59]. Расхождения с результатами, полученными методом ДСК, не превышали 10%.

В работе [14] с использованием КД—спектроскопии были получены интегральные кривые для бромелаина при разных скоростях нагрева. Эти кривые анализировались с помощью уравнений (10) и (15). В последнем случае вместо отношения $\Delta H/(\Delta H - Q)$ использовалось эквивалентное выражение $1/\gamma_N$. Значения энергии активации, полученные с использованием уравнений (10) и (15), отличались друг от друга на 22%, а от значения параметра, полученного методом ДСК, соответственно, на 27 и 7%.

КРИТЕРИИ СООТВЕТСТВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ОДНОСТАДИЙНОЙ МОДЕЛИ

В работе [84] в качестве главного критерия соответствия экспериментальных данных обсуждаемой модели использовалось совпадение значений энергии активации, полученных с помощью разных способов расчета. При этом отмечалось, что способы, предложенные в данной работе, используют разные приближения и разную экспериментальную информацию. Этот критерий использовался и в ряде последующих работ [22, 31, 36, 45, 87, 109]. Анализ табл. 2 показывает, что в ряде случаев разброс значений оказывается существенным. Так, для ацетилхолинэстеразы разница между наибольшим и наименьшим значениями энергии активации, определенными разными способами, составила 15%, а для аннексина — 27%.

Более важный критерий — совпадение значений параметров уравнения Аррениуса, рассчитанных для разных скоростей. К сожа-

лению, в большинстве работ приводятся лишь средние значения параметров, а не значения для конкретных скоростей. Определенное представление о разбросе значений энергии активации, рассчитанных для разных скоростей сканирования, можно получить из значений стандартных ошибок, обычно приводимых вместе со средними значениями параметра. Как видно из табл. 2, в ряде случаев стандартные ошибки составляют более 10% от среднего значения.

Однако из значений стандартных ошибок нельзя определить, имеют ли данные ошибки случайный характер или существует зависимость кажущихся значений параметра от скорости сканирования. В работе [46] было показано, что значение энергии активации для целлюлазы, рассчитанное для скорости сканирования 0,21 град/мин, ниже на 11% значений этого параметра, рассчитанных для скоростей сканирования 0,50, 0,99 и 1,45 град/мин (последние различались между собой менее чем на 0,5% при расчете способом, основанным на уравнении (9)). В этой же работе было показано, что значения энергии активации для ацетилхолинэстеразы, рассчитанные для скоростей сканирования 0,22 и 0,34 град/мин, выше на 8–12% значений этого параметра, рассчитанных для скоростей сканирования 0,76, 0,99 и 1,45 град/мин.

Был предложен также ряд критериев, основанных на построении графических анаморфоз кривых ДСК. В частности, в соответствии с уравнениями (10), (15) и (17), графики в координатах $\{\ln(v/T_m^2); 1/T_m\}$, $\{\ln(\ln[\Delta H/(\Delta H - Q)]); 1/T\}$ и $\{\ln[vC_p^{ex}/(\Delta H - Q)]; 1/T\}$ должны быть линейны.

В работе [13] для β -лактамазы было показано, что график в координатах $\{\ln(\ln[\Delta H/(\Delta H - Q)]); 1/T\}$ близок к линейному, в то время как график в координатах $\{\ln(v/T_m^2); 1/T_m\}$ сильно искривлен. В работе [23] для ксиланазы, напротив, оказалось, что график в координатах $\{\ln(v/T_m^2); 1/T_m\}$ вполне удовлетворяет одностадийной модели, а графики в координатах $\{\ln(\ln[\Delta H/(\Delta H - Q)]); 1/T\}$ и $\{\ln[vC_p^{ex}/(\Delta H - Q)]; 1/T\}$ существенно искривлены.

Уравнение (14) позволяет определить значения константы скорости k для любой температуры (в исследуемом интервале) из кривой ДСК. Рассчитанные таким образом значения k должны совпадать для разных скоростей сканирования [22, 28]. Этим критерием удобно пользоваться, если построить график $\{\ln[vC_p^{ex}/(\Delta H - Q)]; 1/T\}$. В случае выполнимости одностадийной модели, точки, полученные при разных скоростях сканирования, на этом графике должны лежать на одной линии [22, 46].

Следует отметить, что уравнение (14) было выведено без использования предположения о выполнимости уравнения Аррениуса [84].

Таким образом, данный критерий должен выполняться даже в том случае, когда не выполняется уравнение Аррениуса и зависимость $\{\ln [v C_p^{ex}/(\Delta H - Q)]; 1/T\}$ имеет нелинейный характер.

Примером выполнимости данного критерия может служить тепловая денатурация креатинкиназы (рис. 2) [55]. Отметим, что для эффективности применения данного критерия необходимо использовать большое число точек для каждой скорости сканирования. К сожалению, во многих работах использовалось небольшое (5–7) число точек, что снижало надежность сделанных выводов. Так, в работе [31], посвященной тепловой денатурации целлюлазы, для построения линейной анаморфозы $\{\ln [v C_p^{ex}/(\Delta H - Q)]; 1/T\}$ использовалось по 6 точек для каждой скорости сканирования. На

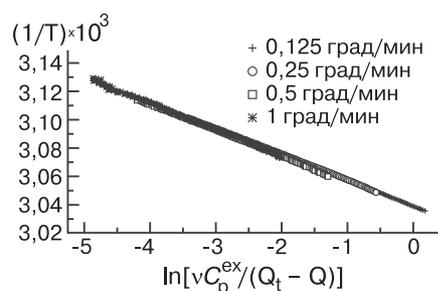


Рис. 2. Зависимости $1/T$ от $\ln[v C_p^{ex}/(\Delta H - Q)]$ для креатинкиназы из скелетных мышц кролика [55].

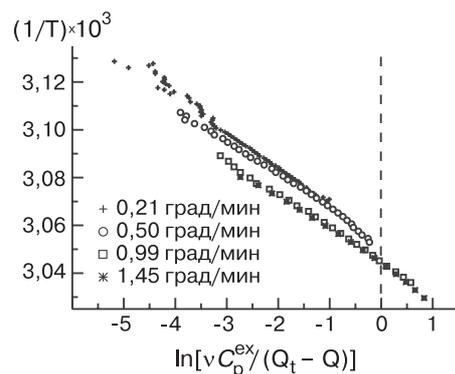


Рис. 3. Зависимости $1/T$ от $\ln[v C_p^{ex}/(\Delta H - Q)]$ для целлюлазы из *Streptomyces halstedii* JM8 [46].

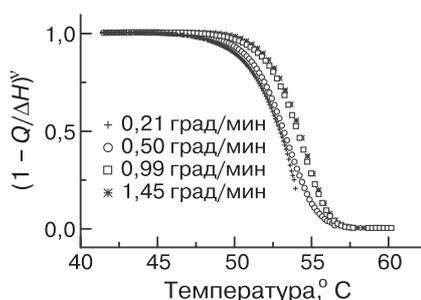
приведенном в этой работе графике использованные точки выглядят лежащими на одной прямой. Однако, при использовании большего числа точек видно, что точки лежат на разных линиях (рис. 3) [46].

В работе [46] было предложено еще два критерия выполнимости одностадийной модели. Было показано, что выражение $(1 - Q/\Delta H)^v$ в случае выполнимости данной модели не зависит от скорости сканирования. Поэтому в координатах $\{(1 - Q/\Delta H)^v; T\}$ линии, соответствующие разным скоростям сканирования, должны совпадать. На рис. 4 показан пример такого графика для целлюлазы [46], из которого видно, что линии в данном случае не совпадают.

Другой критерий связан с построением графических анаморфоз $\{\ln C_p^{ex}; 1/T\}$. Показано, что в данных координатах в случае выполнимости одностадийной модели кривые, построенные для разных ско-

ростей сканирования, имеют одинаковую форму, но сдвинуты друг относительно друга по обеим координатам. Если совместить эти кривые в положении максимума, кривые должны совпасть. На рис. 5 показан пример такого графика для целлюлазы [46], из которого видно, что кривые в данном случае не совпадают.

Анализ, проведенный в работе [46], показал, что графическая анаморфоза в координатах $\{\ln C_p^{ex}; 1/T\}$ наилучшим образом показывает различия в кажущихся значениях энергии активации, рассчитанных для разных скоростей сканирования. Напротив, графические анаморфозы в координатах $\{\ln[vC_p^{ex}/(\Delta H - Q)]; 1/T\}$ и $\{(1 - Q/\Delta H)^v; T\}$ лучше демонстрируют различия в кажущихся значениях параметра T^* . Как можно видеть из рис. 3–5, в одном случае линия, построенная для наименьшей скорости сканирования, сильно отделена от трех других; в двух других случаях сильно расходятся две пары линий.



IV. ОТКЛОНЕНИЯ ОТ ОДНОСТАДИЙНОЙ МОДЕЛИ

НЕСООТВЕТСТВИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ КРИТЕРИЯМ ВЫПОЛНИМОСТИ ОДНОСТАДИЙНОЙ МОДЕЛИ

В работе [22] было отмечено, что тепловая денатурация карбокси-пептидазы В при рН 9,0 (в отличие от процесса при рН 7,5) плохо описывается одностадийной моделью: сильно различаются значения энергии активации, рассчитанные разными методами, и аппроксимация экспериментальных данных уравнением (16) является неудовлетворительной. Аналогичный вывод был сделан для тепловой денатурации бактериородопсина [28].

В работе [29], посвященной тепловой денатурации фосфоглицераткиназы, отмечалось, что одностадийная модель не позволяет адекватно описать данные ДСК, поскольку «константы скорости», рассчитанные для разных скоростей сканирования, не согласуются друг с другом. Аналогичная ситуация наблюдалась для глюкозамин-6-фосфатдезаминазы [39] и β -лактамазы I [13]. Авторы работы [13], кроме того, отметили, что зависимость $\ln(v/T_m^2)$

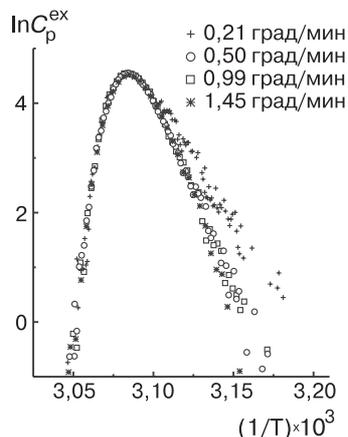


Рис. 5. Зависимости $\ln C_p^{\text{ex}}$ от обратной температуры для целлюлазы из *Streptomyces halstedii* JM8 [46].

тина не удовлетворяет предложенным в этой работе критериям (см. предыдущий раздел и рис. 3–5).

ПОЯВЛЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ЭКЗОТЕРМИЧЕСКОГО ПИКА

В ряде работ отмечалось наличие на кривой ДСК небольшого отрицательного (экзотермического) пика сразу после прохождения основного пика. Такие данные получены для гликогенфосфорилазы *b* из скелетных мышц кролика [17], малатдегидрогеназы из *Escherichia coli* [33], азурина [47, 64] и пластоцианина [65].

В некоторых работах отмечалось, что появление экзотермического пика обусловлено недостатками прибора и не наблюдается при переходе к более совершенной технике [24, 58, 63]. Тем не менее, предполагается, что экзотермический пик может свидетельствовать о протекании экзотермических процессов, сопровождающих денатурацию, в частности, процесса агрегации [17, 33, 47].

Для азурина [47] и пластоцианина [65] показано, что амплитуда экзотермического пика снижается при увеличении скорости сканирования. Авторы объясняют этот эффект в рамках модели Ламри–Эйринга (см. раздел V).

ЗАВИСИМОСТЬ ФОРМЫ КРИВЫХ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

Поскольку одностадийная модель описывается кинетическим уравнением первого порядка (5), в рамках данной модели молярные

от $1/T_m$ имеет нелинейный характер. Отклонение данной зависимости от линейности отмечалось также для кислой протеиназы [100].

В работе [103] отмечались большие значения ошибок в оценке энергии активации для аннексина V (см. табл. 2). Кроме того, приведенные в данной работе графики в координатах $\{\ln(\ln[\Delta H/(\Delta H - Q)]); 1/T\}$ и $\{\ln[vC_p^{\text{ex}}/(\Delta H - Q)]; 1/T\}$ существенно искривлены, а зависимости $\ln[vC_p^{\text{ex}}/(\Delta H - Q)]$ от $1/T$ для разных скоростей сканирования не лежат на одной линии. Сходная картина наблюдалась в работе [23] для ксиланазы.

В работе [46] показано, что тепловая денатурация ацетилхолинэстеразы, целлюлазы и чечевичного лек-

значения избыточной теплоемкости не должны зависеть от концентрации белка. Однако, в ряде работ отмечалось влияние концентрации белка на форму кривой ДСК и на положение максимума.

Так, в работе [29] было показано, что увеличение концентрации фосфоглицераткиназы с 0,2 до 2 мг/мл сдвигает положение максимума примерно на 1,5 градуса в сторону более низких температур. Напротив, увеличение концентрации гликогенфосфорилазы *b* от 0,5 до 6 мг/мл [1], глюкозамин-6-фосфатдезаминазы с 0,6 до 7,3 мг/мл [39] и супероксиддисмутазы от 2,6 до 8,0 мг/мл [34] приводило к сдвигу положения максимума в область более высоких температур, соответственно, на 1, 2,5 и 3 градуса.

В случае термолизина увеличение концентрации белка не влияло существенно на положение максимума, но снижало энтальпию денатурации [20].

Наличие концентрационного эффекта означает существенный вклад бимолекулярных реакций в кинетику денатурации. В случае олигомерных белков (таких как глюкозамин-6-фосфатдезаминаза, супероксиддисмутаза и гликогенфосфорилаза) концентрационный эффект может объясняться вкладом обратимой диссоциации олигомера, которая предшествует стадии денатурации [82]. Для мономерной фосфоглицераткиназы предполагается вклад бимолекулярных процессов агрегации [29], а для термолизина – вклад автолиза [20].

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ СКАНИРОВАНИЯ НА ЭНТАЛЬПИЮ ДЕНАТУРАЦИИ

Во многих работах значения калориметрической энтальпии, рассчитанные для разных скоростей сканирования, существенно различались. С увеличением скорости сканирования от $0,2 \div 0,3$ до 1 град/мин значения ΔH для лектина из чечевицы (при pH 7,4) [59], супероксиддисмутазы [34] и уридинфосфорилазы [54] повышались примерно на 30%, для азурина – на 85% [47], а для пластоцианина – на 100% [65]. Для δ -эндотоксина значение ΔH повышалось на 40% с увеличением скорости сканирования с 0,125 до 2 град/мин [72], а для глутатионредуктазы – на 60% с увеличением скорости сканирования с 0,5 до 1,5 град/мин [79]. Противоположная тенденция наблюдалась для целлюлазы [31]¹ и липазы В [88]: с увеличением скорости сканирования от 0,2 до 1,5 град/мин энтальпия снижалась на $20 \div 25\%$. Для лизоцима в присутствии хлорбутанола энтальпия снижалась на 40% с увеличением скорости сканирования от 0,3 до 1

¹ Рассчитано нами на основании данных, представленных авторами статьи.

град/мин [43]. В случае тепловой денатурации ацетилхолинэстеразы максимальное значение энтальпии наблюдалось для промежуточной скорости сканирования 0,76 град/мин; для скоростей сканирования 0,22 и 1,45 град/мин оно было ниже на $10 \div 15\%$ ¹. Для карбоксипептидазы В и прокариотической карбоксипептидазы В в зависимости от рН и молярности буфера соотношение значений энтальпии, полученных для разных скоростей сканирования (от 0,25 до 2 град/мин), было разным; тем не менее наименьшие значения энтальпии всегда соответствовали наименьшей скорости сканирования, а наибольшие значения — в большинстве случаев наибольшим скоростям сканирования; при рН 9,0 в 20 мМ пирофосфатном буфере разница составляла около 40% [22].

Заметим, что во многих работах не приводятся данные об энтальпии денатурации при разных скоростях сканирования. Следует отметить две работы, в которых энтальпия практически не зависела от скорости сканирования: для аннексина различия в энтальпии не превышали 4% при изменении скорости сканирования от 0,125 до 2,342 град/мин [103]; для креатинкиназы при увеличении скорости сканирования с 0,125 до 1 град/мин энтальпия снижалась всего на 5% [55].

В работах [54, 79] было высказано ошибочное мнение, что энтальпия денатурации не должна зависеть от скорости сканирования, если процесс денатурации приводит к одному и тому же конечному состоянию. Этот вывод был сделан, исходя из того соображения, что энтальпия — функция состояния, поэтому изменение энтальпии не зависит от особенностей перехода между начальным и конечным состояниями, если сами начальное и конечное состояния идентичны.

Однако такие рассуждения не учитывают, что изменение энтальпии в ходе денатурации складывается из двух составляющих. Изменение энтальпии, связанное с процессом денатурации (т.н. избыточная энтальпия) — одна из этих составляющих. Другая составляющая — изменение энтальпии, связанное с увеличением температуры системы. Суммарное изменение энтальпии действительно не должно зависеть от особенностей перехода между начальным и конечным состояниями, но при этом величины каждой составляющей могут изменяться в зависимости от условий перехода (в том числе скорости сканирования).

Такая ситуация возможна, если теплоемкости нативной и денатурированной форм белка не одинаковы. Согласно закону

¹ Рассчитано нами на основании данных, представленных авторами статьи.

Кирхгофа, в этом случае энтальпия процесса зависит от температуры. Обычно теплоемкость денатурированной формы белка больше теплоемкости нативной формы, поэтому с повышением температуры энтальпия денатурации должна увеличиваться. Поскольку при повышении скорости сканирования температурный интервал, при котором происходит денатурация, сдвигается в область более высоких температур, избыточная энтальпия должна увеличиваться.

Таким образом, зависимость избыточной энтальпии от скорости сканирования в принципе не противоречит одностадийному механизму денатурации. Однако, поскольку уравнения (7)–(9) и (13)–(18) были получены исходя из предположения о том, что энтальпия денатурации является константой, эти уравнения в данном случае должны быть скорректированы.

В работе [54] обсуждаются три другие возможные причины зависимости калориметрической энтальпии от скорости сканирования. Одна из них – различия в концентрации белка в экспериментах с разными скоростями сканирования, обусловленные недостаточной точностью при приготовлении белковых растворов. Однако, этой причиной трудно объяснить расхождения, достигающие 30%, а также наличие определенных тенденций зависимости энтальпии от скорости сканирования.

Другая возможная причина – различие конечных состояний белка при разных скоростях сканирования. Такое различие может быть связано с образованием белковых агрегатов, форма которых зависит от скорости денатурации, а следовательно, и от скорости сканирования. Можно предположить, что при более медленной денатурации вклад агрегации больше, а так как агрегация обычно сопровождается выделением тепла, суммарный тепловой эффект процесса оказывается ниже.

Третья возможная причина – неточность при вычитании «химической базовой линии», которая связана с различием в теплоемкости нативной и денатурированной форм белка. Эта процедура обычно проводится по методу Такахаши–Стюртеванта [98]. Данный метод считается вполне корректным для одностадийной модели, то есть для случая, когда в процессе денатурации не появляется заметного количества белка, находящегося в промежуточном состоянии. Если это условие не выполняется, необходимо учитывать также теплоемкость промежуточного состояния, значение которой невозможно измерить.

V. МОДЕЛЬ ЛАМРИ–ЭЙРИНГА И ДРУГИЕ ДВУХСТАДИЙНЫЕ МОДЕЛИ

МОДЕЛЬ ЛАМРИ–ЭЙРИНГА И ЕЕ ЧАСТНЫЕ СЛУЧАИ

В работе, посвященной анализу модели одностадийной необратимой денатурации, Санчез–Руиз и соавт. [84] отмечали, что модель Ламри–Эйринга (1) является более реалистичной моделью денатурации белка, и модель (2) следует рассматривать как частный случай модели Ламри–Эйринга. Позже Санчез–Руиз [82] рассмотрел две ситуации, когда модель Ламри–Эйринга может быть сведена к одностадийной необратимой модели (см. раздел II).

Лепок и соавт. [50] провели теоретический анализ полной кинетической модели Ламри–Эйринга для случая, когда тепловой эффект второй стадии равен нулю. Варьировались соотношения значений k_1 и k_2 для температуры, при которой $k_1 = k_{-1}$, и скорости сканирования. Были определены соотношения, при которых модель Ламри–Эйринга может быть сведена к одностадийной обратимой или одностадийной необратимой моделям.

В работе [3] анализировался наиболее общий случай полной кинетической модели Ламри–Эйринга, когда обе стадии сопровождаются заметным тепловым эффектом. Исследовалось изменение формы кривых при варьировании значений различных параметров модели и скорости сканирования.

Следует отметить, что система дифференциальных уравнений, описывающая полную кинетическую модель Ламри–Эйринга, при переменной температуре не имеет аналитического решения. Это затрудняет использование данной модели. До сих пор нет ни одной работы, в которой данные ДСК удалось бы количественно описать в рамках полной кинетической модели Ламри–Эйринга.

Более простыми двухстадийными моделями являются два частных случая полной кинетической модели Ламри–Эйринга: модель Ламри–Эйринга с быстро устанавливающимся равновесием на первой стадии и модель, включающая две последовательно протекающие необратимые стадии.

МОДЕЛЬ ЛАМРИ–ЭЙРИНГА С БЫСТРО УСТАНОВЛИВАЮЩИМСЯ РАВНОВЕСИЕМ НА ПЕРВОЙ СТАДИИ

Модель (24)



является частным случаем модели (1), когда значения констант скорости k_1 и k_{-1} значительно превышают значение константы k_2 ,

и, таким образом, в каждый момент времени равновесие на первой стадии можно считать установившимся. В работе Санчез–Руиза [82] было получено аналитическое выражение зависимости избыточной теплоемкости от температуры для данной модели для случая, когда тепловой эффект второй стадии равен нулю. Миларди и соавт. [64] получили аналитическое выражение зависимости C_p^{ex} от T для более общего случая:

$$C_p^{\text{ex}} = \left[\frac{K\Delta H_u}{(K+1)^2} \left(\frac{k_2}{v} + \frac{\Delta H_u}{RT^2} \right) + \Delta H_i \frac{1}{v} \frac{k_2 K}{K+1} \right] \exp \left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{k_2 K}{K+1} dT \right), \quad (25)$$

где ΔH_u – изменение энтальпии на первой стадии, ΔH_i – изменение энтальпии на второй стадии, K – константа равновесия для первой стадии ($K = \exp[-\Delta H_u(1/T - 1/T_{1/2})/R]$), k_2 – константа скорости второй стадии ($k = \exp[-E_a(1/T - 1/T^*)/R]$); $T_{1/2}$ – температура, при которой $K = 1$, T^* – температура, при которой $k = 1 \text{ мин}^{-1}$.

Санчез–Руиз [82] провел теоретический анализ модели (24) для случая, когда тепловой эффект второй стадии равен нулю. Миларди и соавт. [64] анализировали ситуацию, когда вторая стадия является экзотермической. В этом случае возможно появление отрицательного пика. Для выбранного авторами набора параметров отрицательный пик появлялся при скоростях сканирования 0,5 град/мин и выше.

В ряде работ предпринимались попытки использовать модель (24) для количественного описания данных ДСК. Так, в работе [103] использовалась формула, полученная Санчез–Руизом [82] при условии, что $\Delta H_i = 0$. Значение E_a (общее для четырех кривых, полученных при разных скоростях сканирования) было рассчитано на основании уравнений (3) и (14), значение ΔH_u для каждой скорости сканирования – как площадь под кривой ДСК. Оптимальные значения параметров $T_{1/2}$ и T^* были подобраны, при этом значения $T_{1/2}$ для скоростей 0,125 и 2,342 град/мин различались на 2,8 градуса, а значения T^* – на 2,1 градуса. Такие различия не дают оснований считать описание адекватным.

В работе [47] данные ДСК для азурина, полученные при скоростях сканирования 0,3, 0,5, 0,7 и 1 град/мин, аппроксимировались уравнением (25). Каждая кривая обрабатывалась отдельно. Для скоростей сканирования 0,5 и 0,7 град/мин получены близкие результаты, в то же время оптимальные значения параметров,

полученные для скоростей 0,7 и 1 град/мин, различались: ΔH_i – на 12%, E_a – в 2,7 раза, T^* – на 5,8 градуса. Столь же большие различия наблюдались и в случае данных ДСК для азурина в D_2O [37]. Из этих результатов невозможно сделать вывод, что тепловая денатурация азурина подчиняется модели (24). Аналогичные результаты были получены той же группой авторов для пластоцианина – оптимальные значения параметров, полученные для скоростей 0,3 и 0,7 град/мин, различались: ΔH_i – в 2,8 раза, E_a – на 15%, T^* – на 5,9 градуса [65].

МОДЕЛЬ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ НЕСКОЛЬКО ОБРАТИМЫХ И ОДНУ НЕОБРАТИМУЮ СТАДИИ

В работе [26] анализируется более общая модель, включающая несколько последовательно протекающих обратимых стадий и на конце одну необратимую:



Как и для модели (24), здесь предполагается, что в каждый момент времени равновесие на всех обратимых стадиях можно считать установившимся. Для данной модели авторы [26] получили следующее уравнение:

$$\Delta H - Q = (\Delta H - Q_e) \exp -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_{app} dT, \quad (27)$$

где Q – текущее количество теплоты, поглощаемое в процессе денатурации, Q_e – текущее количество теплоты, поглощаемое на обратимых стадиях, k_{app} – кажущаяся константа скорости первого порядка.

Имея несколько кривых ДСК, полученных при разных скоростях сканирования, можно для каждой температуры построить зависимость Q от $1/v$. Поскольку Q_e и k_{app} не зависят от скорости сканирования, данная зависимость имеет экспоненциальный характер. Экстраполяция полученной кривой к бесконечно большой скорости сканирования ($1/v = 0$) дает значение Q_e . Таким образом можно построить зависимость значений Q_e от температуры и получить значение изменения энтальпии на обратимых стадиях.

Этот метод использовался при анализе тепловой денатурации супероксиддисмутазы [34], азурина [47] и пластоцианина [65]. В работе [39], посвященной тепловой денатурации глюкозамин-6-фосфатдезаминазы, для экстраполяции использовалась зависимость $\ln(1 - Q/\Delta H)$ от $1/v$.

МОДЕЛЬ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ РАВНОВЕСНУЮ ДИССОЦИАЦИЮ

В работе Санчез–Руиза [82] теоретически исследуется вариант модели Ламри–Эйринга, когда первая стадия представляет обратимую диссоциацию олигомерного белка на субъединицы:



где μ – число субъединиц в олигомере. Рассмотрен лишь случай, когда равновесие на первой стадии устанавливается быстро, а $K = [U]^\mu / [N_\mu] \ll 1$. Для этого случая получено выражение для зависимости избыточной теплоемкости от температуры, аналогичное выражению (16) для одностадийной модели:

$$C_p^{\text{ex}} = \frac{\Delta H E_{a,\text{app}}}{RT_m^2} \exp\left[\frac{E_{a,\text{app}}(T - T_m)}{RT_m^2}\right] \times \left\{ 1 + \frac{1 - \mu}{\mu} \exp\left[\frac{E_{a,\text{app}}(T - T_m)}{RT_m^2}\right]^{1/(\mu - 1)} \right\}, \quad (29)$$

где $E_{a,\text{app}}$ – кажущаяся энергия активации, равная $E_a + \Delta H/\mu$.

Получено также уравнение, связывающее температуру, соответствующую максимальному значению избыточной теплоемкости (T_m), с общей концентрацией белка (C_t):

$$E_{a,\text{app}}/(RT_m) - 2 \ln T_m + (\mu - 1)/\mu \ln C_t = \text{const}. \quad (30)$$

Поскольку величина члена $2 \ln T_m$ меняется с изменением значения T_m в значительно меньшей степени, чем величина члена $E_{a,\text{app}}/(RT_m)$, зависимость $\ln C_t$ от $1/T_m$ в рамках данной модели должна представлять собой прямую линию.

МОДЕЛЬ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ДВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО ПРОТЕКАЮЩИЕ НЕОБРАТИМЫЕ СТАДИИ

Еще одним частным случаем полной кинетической модели Ламри–Эйринга является модель, включающая две последовательно протекающие необратимые стадии:



Эта модель реализуется для ситуации, когда скорость обратной реакции на первой стадии мала по сравнению со скоростью второй стадии ($k_{-1} \ll k_2$). В отличие от одностадийной необратимой модели в данном случае скорость прямой реакции первой стадии сравнима по величине со скоростью второй стадии.

Нами проведен теоретический анализ модели (31) [2]. Получено аналитическое выражение зависимости C_p^{ex} от T [2, 54]:

$$C_p^{\text{ex}} = \frac{\Delta H_1 k_1}{v} \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_1 dT\right) + \frac{\Delta H_2 k_2}{v^2} \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_2 dT\right) \int_{T_0}^T \left[k_1 \exp\left(\frac{1}{v} \int_{T_0}^T (k_2 - k_1) dT\right) \right] dT \quad (32)$$

(индексы 1 и 2 относятся, соответственно, к первой и второй стадиям).

С учетом предположения, что константы скорости k_1 и k_2 подчиняются уравнению Аррениуса (4), зависимость избыточной теплоемкости от температуры определяется скоростью сканирования v и шестью параметрами процесса денатурации: энтальпией, энергией активации и параметром T^* для каждой стадии.

Как видно из уравнения (32), значение избыточной теплоемкости является суммой двух слагаемых, соответствующих двум стадиям процесса. Поэтому профиль C_p^{ex} от T можно разложить на две составляющие. Первое слагаемое в уравнении (32) аналогично выражению для избыточной теплоемкости (9), полученному для одностадийной модели. Его величина определяется скоростью сканирования и тремя параметрами первой стадии. Второе слагаемое в уравнении (32), соответствующее второй стадии процесса, зависит от параметров не только этой, но и первой стадии (кроме ΔH_1). Это понятно, так как скорость второй стадии определяется не только константой скорости для этой стадии, но и концентрацией формы U, образующейся на первой стадии.

В зависимости от соотношений значений параметров модели кривые ДСК, удовлетворяющие данной модели, могут представлять один пик (с разной степенью асимметрии) или состоять из двух пиков. Если вторая стадия экзотермическая ($\Delta H_2 < 0$), второй пик будет отрицательным, так же как для модели Ламри–Эйринга с быстро устанавливающимся равновесием на первой стадии.

Скорость сканирования может существенно влиять на форму кривой ДСК. Так, при $E_{a,1} > E_{a,2}$ чем больше скорость сканирования, тем быстрее процесс переходит в область, где k_1 становится больше, чем k_2 , и где происходит накопление интермедиата U. В результате при больших скоростях сканирования на кривых ДСК может появиться второй пик (или плечо), отсутствующий на кривых, соответствующих малым скоростям сканирования (рис. 6а). Напро-

тив, при $E_{a,1} < E_{a,2}$, когда накоплению интермедиата способствуют более низкие температуры, разделение пиков происходит более эффективно при меньших скоростях сканирования (рис. 6б).

Появление отрицательного пика в случае экзотермической второй стадии также может зависеть от скорости сканирования. На рис. 7 показан случай, когда при малой скорости (0,25 град/мин) отрицательный пик практически незаметен, а с повышением скорости сканирования он становится все более существенным.

С помощью модели (31) нами была описана тепловая денатурация уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* K-12 [4, 54]. Кривые ДСК были получены при скоростях сканирования 0,25, 0,5 и 1 град/мин. Проверялось соответствие данных кривых трем моделям: одностадийной модели необратимой денатурации (2), модели Ламри-Эйринга с быстро уста-

Рис. 7. Влияние скорости сканирования на величину отрицательного пика при экзотермической второй стадии для модели (31) [2].

Для всех кривых $E_{a,1} = E_{a,2} = 500$ кДж/моль, $\Delta H_1 = 600$ кДж/моль, $\Delta H_2 = -200$ кДж/моль, $T_1^* = T_2^* = 328,16$ К (55 °С). Значения v указаны над кривыми.

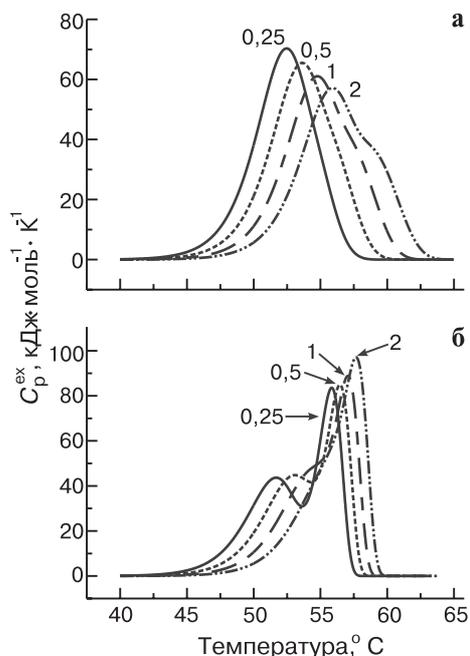
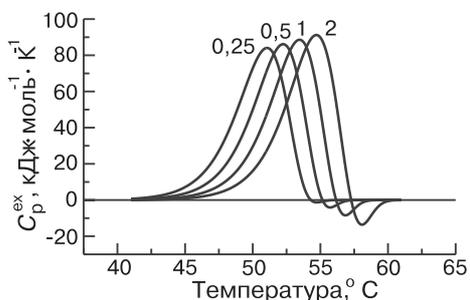


Рис. 6. Влияние скорости сканирования на форму температурных профилей избыточной теплоемкости для модели (31) [2].

Для всех кривых $E_{a,1} = 500$ кДж/моль, $\Delta H_1 = \Delta H_2 = 200$ кДж/моль, $T_1^* = 328,16$ К (55 °С). Значения $E_{a,2}$: 350 (а), 1000 кДж/моль (б), значения T_2^* : 332,16 К (а), 330,16 К (б). Значения v указаны над кривыми.



навливающимся равновесием на первой стадии (24) и модели (31), включающей две последовательно протекающие необратимые стадии. Аппроксимация проводилась одновременно по всем кривым, так как для двухстадийных моделей (24) и (31), содержащих, соответственно, пять и шесть параметров, точность оценки параметров с использованием одной кривой получается довольно низкой.

Оказалось, что модель (31) описывает тепловую денатурацию уридинфосфорилазы с большей точностью, чем две другие модели.

Если для моделей (2) и (24) коэффициент корреляции, отражающий соответствие между теоретическими и экспериментальными кривыми составлял 0,994, а отклонения отдельных экспериментальных точек от теоретических кривых доходили до 10% от максимального значения избыточной теплоемкости, то для модели (31) коэффициент корреляции составил 0,999, а максимальное отклонение экспериментальных точек от теоретических кривых не превышало 5% от максимального значения избыточной теплоемкости. На рис. 8 видно, что теоретические кривые хорошо совпадают с экспериментальными. Таким образом, был сделан вывод, что тепловая денатурация уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* К-12 удовлетворительно описывается моделью, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии [4, 54].

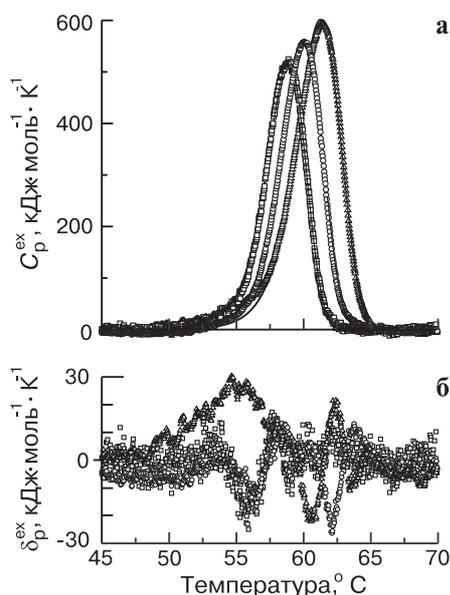


Рис. 8. Результаты аппроксимации уравнением (32) экспериментальных температурных профилей избыточной теплоемкости, полученных для уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* при скоростях сканирования температуры: 0,25 град/мин (прямоугольники), 0,5 град/мин (кружки) и 1 град/мин (треугольники); а – экспериментальные данные и теоретические кривые (сплошные линии), б – остаточные разности (δ) [4, 54].

VI. БОЛЕЕ СЛОЖНЫЕ МОДЕЛИ

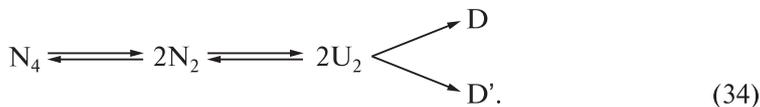
В работах группы Лепока денатурация Ca^{2+} -АТФазы [12, 51] и супероксиддисмутазы [49] была описана с помощью модели, включающей две независимо протекающие необратимые реакции.

В работе Николовой и соавт. [69] была получена сигмоидальная зависимость логарифма константы скорости инактивации экзо-глюканазы/ксиланазы (Сех) от обратной температуры. На основании этой зависимости была предложена модель денатурации, включающая одну обратимую и две необратимые стадии, которые приводят к двум различным продуктам:



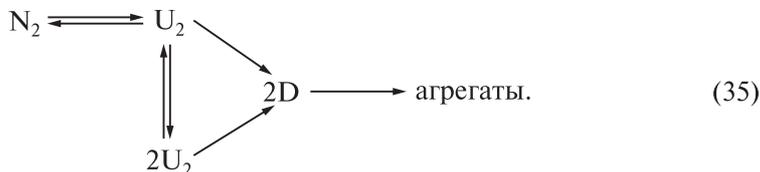
С помощью данной модели описывались данные по кинетике инактивации фермента. О попытках описать данные ДСК с помощью модели (33) ничего не известно.

В работе [79] высказано предположение, что тепловая денатурация тетрамерной глутатионредуктазы подчиняется механизму, включающему обратимую диссоциацию на димеры, обратимое разворачивание димеров и последующее образование двух разных агрегированных форм белка:



Никаких попыток описать экспериментальные данные с помощью этой модели не было.

В работе Корнилаева и соавт. [1] на основании данных ДСК, изотермической денатурации и седиментации для гликогенфосфоорилазы *b* предложена модель денатурации фермента, включающая обратимую предденатурационную стадию, обратимую диссоциацию димерного белка на мономеры и параллельно протекающие необратимые стадии денатурации димера и мономеров:



Эта модель также не была реализована в виде математического описания.

В работе Галистео и соавт. [29] на основании данных по зависимости скорости инактивации фосфолицераткиназы и положения максимума на кривых ДСК от концентрации фермента было предложено эмпирическое уравнение, описывающее кинетику денатурации:

$$\frac{dC_N}{dT} = -\frac{1}{v} \frac{\alpha(T)C_N^2}{\beta(T) + C_N} dT, \quad (36)$$

где C_N – концентрация нативной формы белка, $\alpha(T)$ и $\beta(T)$ – параметры, зависящие от температуры. Зависимость $\ln\alpha$ от температуры оказалась линейной, а $\ln\beta$ – параболической.

VII. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОВТОРНОГО СКАНИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ КРИВЫХ СЛОЖНОЙ ФОРМЫ

В разделе II обсуждалось использование повторного прогрева для выяснения вопроса об обратимости процесса денатурации. Для этой цели повторный прогрев проводится после завершения процесса. Однако, если остановить прогрев в момент, когда денатурация еще не закончена, охладить образец и провести повторное сканирование, можно получить новую информацию о механизме денатурации.

Так, в случае выполнимости одностадийной модели, при повторном прогреве должен воспроизводиться тот же пик, что и при первом сканировании, но уменьшенный по амплитуде в соответствии с долей белка, оставшегося нативным после первого прогрева и охлаждения. На рис. 9 показан результат повторного сканирования для липазы В [88]. Видно, что первоначальная кривая может быть получена из повторного скана, если все точки последнего умножить на отношение калориметрических энтальпий этих двух сканов. Аналогичные результаты получены для δ -эндотоксина [72].

Иная ситуация описана для гликогенфосфоорилазы *b*: при повторном прогреве наблюдался пик не только меньший по амплитуде, но также смещенный на $1,5^\circ$ в сторону более высоких температур [17]. В работе, посвященной тепловой денатурации гемоцианина [36], белок выдерживался в течение часа при температуре, при которой время полупревращения, рассчитанное на основании одностадийной модели, составляет 20 мин. Затем образец был охлажден. Повторный прогрев показал пик меньший по амплитуде и смещенный на $2,5^\circ$ в сторону более высоких температур. Это ясно указывает на то, что механизм тепловой денатурации гликоген-

фосфорилазы и гемоцианина имеет более сложный характер, чем одностадийное превращение.

В работе [93] образцы глутаматдегидрогеназы нагревались до разных температур (ниже положения максимума), охлаждались и сканировались повторно. К сожалению, в данной работе не сообщается, как изменялось положение максимума при повторных прогревах. Авторами была построена зависимость доли необратимо денатурированного белка (рассчитанного из отношения энтальпии при повторном сканировании к полной энтальпии) от температуры, до которой образец был прогрет при первом проходе. Однако полученная интегральная кривая оказалась смещенной в область более низких температур по сравнению с кривой ДСК. По-видимому, это связано с тем, что процесс необратимой денатурации продолжался и при охлаждении. В работах [55, 88] количество белка, сохранившего свою нативную форму при первом прогреве и охлаждении также было меньше рассчитанного исходя из одностадийной модели.

В случае мультидоменных белков или систем, состоящих из нескольких белков, кривые ДСК могут иметь сложную форму, включать несколько взаимно перекрывающихся пиков. Для анализа таких систем для случаев необратимой денатурации в работах Шнырова и соавторов был развит метод «последовательного отжига».

Суть метода состоит в следующем. Вначале получают полную кривую ДСК, которая дает грубую информацию о числе пиков и положениях максимума для этих пиков. Далее новый образец того же состава нагревается в калориметре до температуры на 1–2° выше положения максимума первого пика (первый скан). Затем образец охлаждается до начальной температуры и вновь нагревается — на этот раз до температуры, на 1–2° выше положения максимума второго пика (второй скан). Вычитая второй скан из первого, получают восходящую часть кривой, соответствующей первому

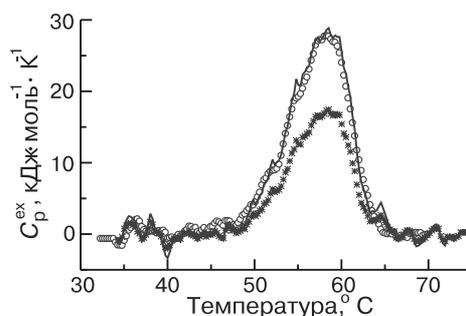


Рис. 9. Кривые ДСК для липазы В при исходном и повторном сканировании (скорость сканирования 59,5 град/час) [88].

Кружки — исходный прогрев; звездочки — повторный прогрев после первого прогрева до 51,1 °С и охлаждения до 15 °С; сплошная линия — повторный прогрев, умноженный на отношение энтальпий исходного и повторного прогрева.

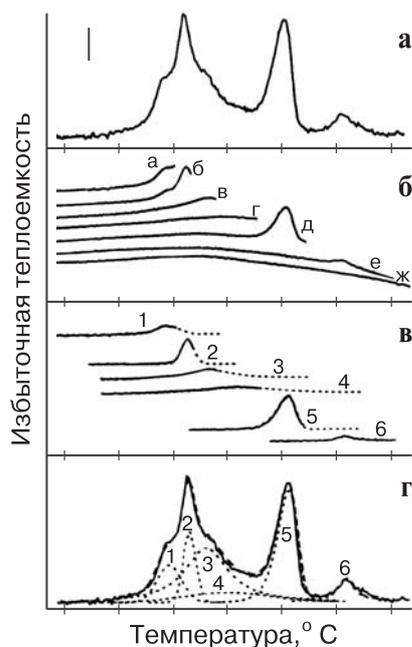


Рис. 10. Демонстрация метода «последовательного отжига» на примере теней эритроцитов свиньи [108].

(а) Калориметрический профиль суспензии теней эритроцитов свиньи в 20 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7,4, при скорости сканирования 1 град/мин. Вертикальный отрезок соответствует 100 кал на градус на кг белка.

(б) Последовательно полученные калориметрические кривые.

(в) Результаты вычитания последующих калориметрических кривых из предыдущих (прерывистые линии – результаты экстраполяции).

(г) Результат разложения исходной калориметрической кривой (сплошная линия) на индивидуальные компоненты (прерывистые линии).

переходу (разворачиванию первого домена или белка). Нисходящая часть кривой восстанавливается путем экстраполяции. Подобная процедура повторяется до тех пор, пока не будут пройдены все пики. После завершения эксперимента полученные индивидуальные кривые суммируются, образуя общую кривую, которая должна совпасть с исходной; при этом для всех индивидуальных кривых (кроме первой) необходимо подбирать масштабный коэффициент, учитывающий снижение количества нативной формы данного белка или домена в ходе предыдущих прогревов (см. рис. 10).

Впервые метод «последовательного отжига» был использован для калориметрического анализа теней эритроцитов человека [91]. Впоследствии этот метод был применен к субфрагменту 1 миозина [11] (см. также обзор [52]), комплексу α -лактальбумина с Zn^{2+} [70], пурпурным мембранам *Halobacterium halobium* [86, 89], лакказе I из лигнин–разрушающих базидомицетов [19], вирусу Newcastle disease [92] и теням эритроцитов свиньи [108].

В первых работах [11, 19, 70, 86, 89, 91] экстраполяция нисходящей части кривых проводилась исходя из предположения, что кривая симметрична. Однако это предположение противоречит

тому факту, что при одностадийной необратимой денатурации кривые имеют четко выраженную асимметрию. В последних работах [92, 108] для экстраполяции использовалось уравнение (16), полученное для одностадийной необратимой модели.

Аналогичный метод в более простой форме применялся для анализа тепловой денатурации миелина [81] и химерной 3-изопротилмалатдегидрогеназы [38].

В работе [62] исследовалась тепловая денатурация маннитолпермеазы. Кривая ДСК состояла из двух пиков. После прохождения первого пика и охлаждения кривая полностью воспроизводилась, после прохождения второго пика и охлаждения — не воспроизводился ни один пик. Кроме того, положение первого пика не зависело от скорости сканирования, а второго — зависело. Авторы сделали вывод, что первый пик относится к обратимому плавлению доменов А и В, а второй пик соответствует необратимой денатурации домена С.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в настоящем обзоре данные свидетельствуют, что проблема анализа данных ДСК для случаев необратимой тепловой денатурации белка еще далека от разрешения. Необходима разработка более сложных моделей, чем модель одностадийной денатурации. Эти модели должны включать как необратимые, так и обратимые стадии, в том числе стадии диссоциации олигомерного белка на мономеры, а также возможность протекания параллельных процессов.

С другой стороны, анализ необратимой тепловой денатурации требует получения экспериментальных данных с использованием различных подходов. В первую очередь следует отметить необходимость проведения калориметрических экспериментов с применением разных скоростей сканирования и разных концентраций белка. Кроме того, чрезвычайно полезным является использование повторного сканирования после первичного прогрева до разных температурных пределов. Важно также совмещение метода ДСК с другими методами, позволяющими изучать тепловую денатурацию белков.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 99-04-48639 и 00-15-97787).

ЛИТЕРАТУРА

1. Корнилаев Б.А., Курганов Б.И., Ерошина Т.Б., Чеботарева Н.А., Ливанова Н.Б., Орлов В.Н., Черняк В.Я. // Молекул. биология. 1997. Т. 31. С. 98–107.
2. Любарев А.Е., Курганов Б.И. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 516–523.
3. Любарев А.Е., Курганов Б.И. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 990–997.
4. Любарев А.Е., Курганов Б.И., Буракова А.А., Орлов В.Н., Поглазов Б.Ф. // Докл. РАН. 1998. Т. 358. С. 830–832.
5. Макаров А.А., Протасевич И.И., Гришина И.Б., Лобачев В.М., Бажулина Н.П., Есипова Н.Г. // Молекул. биология. 1994. Т. 28. С. 1346–1353.
6. Потехин С.А., Ковригин Е.Л. // Биофизика. 1998. Т. 43. С. 223–232.
7. Привалов П.Л. // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 742–759.
8. Сабурова Е.А., Хечинашвили Н.Н., Елфимова Л.И. // Молекул. биология. 1996. Т. 30. С. 1219–1228.
9. Уверский В.Н. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 306–325.
10. Цоу Ч.–Л. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 300–307.
11. Шныров В.Л., Левицкий Д.И., Веденкина Н.С., Николаева О.П., Хворов Н.В., Пермяков Е.А., Поглазов Б.Ф. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 304. С. 1497–1499.
12. Anteneodo C., Rodahl M., Meiering E., Heunen M.L., Sennisterra G.A., Lerock J.R. // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 12283–12290.
13. Arriaga P., Menéndez M., Villacorta J.M., Laynez J. // Biochemistry. 1992. Vol. 31. P. 6603–6607.
14. Arroyo–Reyna A., Hernández–Araña A. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. Vol. 1248. P. 123–128.
15. Azuaga A.I., Sepulcre F., Padrys E., Mateo P.L. // Biochemistry. 1996. Vol. 35. P. 16328–16335.
16. Bertazzon A., Tian G.H., Lamblin A., Tsong T.Y. // Biochemistry. 1990. Vol. 29. P. 291–298.
17. Centeno F., Fernandez–Salguero P., Laynez J.L., Gutierrez–Merino C. // J. Bioenerg. Biomembr. 1992. Vol. 24. P. 625–634.
18. Cervera J., Conejero–Lara F., Ruiz–Sanz J., Galisteo M.L., Mateo P.L., Lusty C.J., Rubio V. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 12504–12511.
19. Coll P.M., Pürez P., Villar E., Shnyrov V.L. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1994. Vol. 34. P. 1097–1098.
20. Conejero–Lara F., Azuaga A.I., Mateo P.L. // Reactive & Functional Polymers. 1997. Vol. 34. P. 113–120.
21. Conejero–Lara F., Mateo P.L., Aviles F.X., Sanchez–Ruiz J.M. // Biochemistry. 1991. Vol. 30. P. 2067–2072.
22. Conejero–Lara F., Sónchez–Ruiz J.M., Mateo P.L., Burgos F.J., Vendrell J., Avilés F.X. // Eur. J. Biochem. 1991. Vol. 200. P. 663–670.
23. Davoodi J., Wakarchuk W.W., Surewicz W.K., Carey P.R. // Protein Sci. 1998. Vol. 7. P. 1538–1544.
24. Edge V., Allewell N.M., Sturtevant J.M. // Biochemistry. 1985. Vol. 24. P. 5899–5906.
25. Epan R.F., Epan R.M., Jung C.Y. // Biochemistry. 1999. Vol. 38. P. 454–458.
26. Freire E., van Osdol W.W., Mayorga O.L., Sónchez–Ruiz J.M. // Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 1990. Vol. 19. P. 159–188.

27. Fujita S.C., Go N., Imahori K. // Biochemistry. 1979. Vol. 18. P. 24–28.
28. Galisteo M.L., Conejero–Lara F., N^oñez J., S^onchez–Ruiz J.M., Mateo P.L. // Thermochim. Acta. 1992. Vol. 199. P. 147–157.
29. Galisteo M.L., Mateo P.L., S^onchez–Ruiz J.M. // Biochemistry. 1991. Vol. 30. P. 2061–2066.
30. Galisteo M.L., S^onchez–Ruiz J.M. // Eur. Biophys. J. 1993. Vol. 22. P. 25–30.
31. Garda–Salas A. L., Santamar^oa R. I., Marcos M. J., Zhadan G. G., Villar E., Shnyrov V. L. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1996. Vol. 38. P. 161–170.
32. Goins B., Freire E. // Biochemistry. 1988. Vol. 27. P. 2046–2052.
33. Goward C.R., Miller J., Nicholls D.J., Irons L.I., Scawen M.D., O'Brien R., Chowdhry B.Z. // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 224. P. 249–255.
34. Grasso D., La Rosa C., Milardi D., Fasone S. // Thermochim. Acta. 1995. Vol. 265. P. 163–175.
35. Gupta M.N. (Ed.) Thermostability of Enzymes. Berlin: Springer and New Delhi: Narosa Publ. House, 1993. 213 p.
36. Guzm^on–Casado M., Parody–Morreale A., Mateo P. L., S^onchez–Ruiz J. M. // Eur. J. Biochem. 1990. Vol. 188. P. 181–185.
37. Guzzi R., Sportelli L., La Rosa C., Milardi D., Grasso D. // J. Phys. Chem. B. 1998. Vol. 102. P. 1021–1028.
38. Hayashi–Iwasaki Y., Numata K., Yamagishi A., Yutani K., Sakurai M., Tanaka N. // Protein Sci. 1996. Vol. 5. P. 511–516.
39. Hern^ondez–Arana A., Rojo–Dominguez A., Altamirano M.M., Calcagno M.L. // Biochemistry. 1993. Vol. 32. P. 3644–3648.
40. Hu C.Q., Sturtevant J.M. // Biochemistry. 1987. Vol. 26. P. 178–182.
41. Jaenicke R. // Royal Soc. Philos. Transact. B. 1995. Vol. 348. P. 97–105.
42. Karplus M., J^ohli A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. Vol. 5. P. 58–73.
43. Kishore N., Sabulal B. // Pure Appl. Chem. 1998. Vol. 70. P. 665–670.
44. Klibanov A.M., Ahern T.J. // Protein Engineering / Eds. D.L.Oxenber, C.F.Fox. New York: Liss. 1987. P. 213–218.
45. Kreimer D.I., Shnyrov V.L., Villar E., Silman I., Weiner L. // Protein Sci. 1995. Vol. 4. P. 2349–2357.
46. Kurganov B.I., Lyubarev A.E., S^onchez–Ruiz J.M., Shnyrov V.L. // Biophys. Chem. 1997. Vol. 69. P. 125–135.
47. La Rosa C., Milardi D., Grasso D., Guzzi R., Sportelli, L. // J. Phys. Chem. 1995. Vol. 99. P. 14864–14870.
48. Le Bihan T., Gicquaud C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 194. P. 1065–1073.
49. Lepock J.R., Frey H.E., Hallewell R.A. // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 21612–21618.
50. Lepock J.R., Ritchie K.P., Kolios M.C., Rodahl A.M., Heinz K.A., Kruuv J. // Biochemistry. 1992. Vol. 31. P. 12706–12712.
51. Lepock J.R., Rodahl A.M., Zhang C., Heynen M.L., Waters B., Cheng K.-H. // Biochemistry. 1990. Vol. 29. P. 681–689.
52. Levitsky D.I. // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 1993. Vol. 12. Pt. 1. 55 p.
53. Lumry R., Eyring H. // J. Phys. Chem. 1954. Vol. 58. P. 110–120.

54. Lyubarev A.E., Kurganov B.I., Burlakova A.A., Orlov V.N. // *Biophys. Chem.* 1998. Vol. 70. P. 247–257.
55. Lyubarev A.E., Kurganov B.I., Orlov V.N., Zhou H.–M. // *Biophys. Chem.* 1999. Vol. 79. P. 199–204.
56. Makarov A.A., Protasevich I.I., Frank E.G., Grishina I.B., Bolotina I.A., Esipova N.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. Vol. 1078. P. 283–288.
57. Makhatadze G.I., Privalov P.L. // *Adv. Protein Chem.* 1995. Vol. 47. P. 307–425.
58. Manly S.P., Matthews K.S., Sturtevant J.M. // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 3842–3846.
59. Marcos M.J., Chehin R., Arrondo J.L., Zhadan G.G., Villar E., Shnyrov V.L. // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 443. P. 192–196.
60. Martinez J.C., Filimonov V.V., Mateo P.L., Schreiber G., Fersht A.R. // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34. 5224–5233.
61. Medved L., Litvinovich S., Ugarova T., Matsuka Y., Ingham K. // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 4685–4693.
62. Meijberg W., Schuurman–Wolters G.K., Boer H., Scheek R.M., Robillard G.T. // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 20785–20794.
63. Merabet E.K., Walker M.C., Yuen H.K., Sikorski J.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1161. P. 272–278.
64. Milardi D., La Rosa C., Grasso D. // *Biophys. Chem.* 1994. Vol. 52. P. 183–189.
65. Milardi D., La Rosa C., Grasso D., Guzzi R., Sportelli L., Fini C. // *Eur. Biophys. J.* 1998. Vol. 27. P. 273–282.
66. Miles C.A. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1993. Vol. 15. P. 265–271.
67. Miles C.A., Burjanadze T.V., Bailey A.J. // *J. Mol. Biol.* 1995. Vol. 245. P. 437–446.
68. Morin P.E., Diggs D., Freire E. // *Biochemistry.* 1990. Vol. 29. P. 781–788.
69. Nikolova P.V., Creagh A.L., Duff S.J.B., Haynes C.A. // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 1381–1388.
70. Permyakov E.A., Shnyrov V.L., Kalinichenko L.P., Kuchar A., Reyzer I.L., Berliner L.J. // *J. Prot. Chem.* 1991. Vol. 10. P. 577–584.
71. Plaza del Pino I.M., Pace C.N., Freire E. // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31. P. 11196–11202.
72. Potekhin S.A., Loseva O.I., Tiktopulo E.I., Dobritsa A.P. // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 4121–4127.
73. Privalov P.L. // *Adv. Protein Chem.* 1979. Vol. 33. P. 167–241.
74. Privalov P.L. // *Adv. Protein Chem.* 1982. Vol. 35. P. 1–104.
75. Privalov P.L. // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1989. Vol. 18. P. 47–69.
76. Privalov P.L. // *Pure Appl. Chem.* 1980. Vol. 52. P. 479–497.
77. Privalov P.L., Potekhin S.A. // *Meth. Enzymol.* 1986. Vol. 131. P. 4–51.
78. Protasevich I., Ranjbar B., Lobachov V., Makarov A., Gilli R., Briand C., Lafitte D., Haiech J. // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 2017–2024.
79. Rojo–Domingues A., Hernández–Arana A., Mendoza–Hernández G., Rendyn J.L. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. Vol. 42. P. 631–639.
80. Ross P.D., Shrake A. // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 11196–11202.
81. Ruiz–Sanz J., Ruiz–Cabello J., Lopez–Mayorga O., Cortijo M., Mateo P.L. // *Eur. Biophys. J.* 1992. Vol. 21. P. 169–178.

82. *Sánchez-Ruiz J.M.* // *Biophys. J.* 1992. Vol. 61. P. 921–935.
83. *Sánchez-Ruiz J.M.* // *Proteins: Structure, Function, and Engineering (Subcellular Biochemistry, Vol. 24)* / Eds. B.B. Biswas, S. Roy. New York: Plenum Press. 1995. P. 133–176.
84. *Sánchez-Ruiz J.M., Lopüz-Lacomba J.L., Cortijo M., Mateo P.L.* // *Biochemistry.* 1988. Vol. 27. P. 1648–1652.
85. *Sánchez-Ruiz J.M., Lopüz-Lacomba J.L., Mateo P.L., Vilanova M., Serra M.A., Aviles F.X.* // *Eur. J. Biochem.* 1988. Vol. 176. P. 225–230.
86. *Shnyrov V.L.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994. Vol. 34. P. 281–286.
87. *Shnyrov V.L., Marcos M.J., Villar E.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996. Vol. 39. P. 647–656.
88. *Shnyrov V.L., Martinez L.D., Roig M.G., Lyubarev A.E., Kurganov B.I., Villar E.* // *Thermochim. Acta.* 1999. Vol. 325. P. 143–149.
89. *Shnyrov V.L., Mateo P.L.* // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 324. P. 237–240.
90. *Shnyrov V.L., Sanchez-Ruiz J.M., Boiko B.N., Zhadan G.G., Permyakov E.A.* // *Thermochim. Acta.* 1997. Vol. 302. P. 165–180.
91. *Shnyrov V.L., Zhadan G.G., Akoev I.G.* // *Bioelectromagnetics.* 1984. Vol. 5. P. 411–418.
92. *Shnyrov V.L., Zhadan G.G., Cobaleda C., Sagrera A., Mucoz-Barroso I., Villar E.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1997. Vol. 341. P. 89–97.
93. *Singh N., Liu Z., Fisher H.F.* // *Biophys. Chem.* 1996. Vol. 63. P. 27–36.
94. *Srinivas V.R., Singha N.C., Schwarz F.P., Surolia A.* // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 425. P. 57–60.
95. *Sturtevant J.M.* // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1987. Vol. 38. P. 463–488.
96. *Surolia A., Sharon N., Schwartz F.P.* // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 17697–17703.
97. *Surolia A., Swaminathan C.P., Ramkumar R., Podder S.K.* // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 409. P. 417–420.
98. *Takahashi K., Sturtevant J.M.* // *Biochemistry.* 1981. Vol. 20. P. 6185–6190.
99. *Taubes G.* // *Science.* 1996. Vol. 271. P. 1493–1495.
100. *Tello-Solis S.R., Hernández-Arana A.* // *Biochem. J.* 1995. Vol. 311. P. 969–974.
101. *Villaverde J., Cladera J., Hartog A., Berden J., Padrys E., Dumach M.* // *Biophys. J.* 1998. Vol. 75. P. 1980–1988.
102. *Villaverde J., Cladera J., Padrys E., Rigaud J.-L., Dumach M.* // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 244. P. 441–448.
103. *Vogl T., Jatzke C., Hinz H.-J., Benz J., Huber R.* // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 1657–1668.
104. *Volkin D.B., Klibanov A.M.* // *Dev. Biol. Stand.* 1992. Vol. 74. P. 73–80.
105. *Wang Z.-Y., Freire E., McCarty R.E.* // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 20785–20790.
106. *Wetzel R.* // *Cell.* 1996. Vol. 86. P. 699–702.
107. *Zale S.E., Klibanov A.M.* // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25. P. 5432–5444.
108. *Zhadan G.G., Cobaleda C., Jones A.L., Leal F., Villar E., Shnyrov V.L.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. Vol. 42. P. 11–20.

109. *Zhadan G.G., Shnyrov V.L.* // *Biochem. J.* 1994. Vol. 299. P. 731–733.
110. *Zhang Y.-L., Zhou J.-M., Tsou C.-L.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1164. P. 61–67.