

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»

На правах рукописи

ФАТХУТДИНОВА АЛИСА АМИРОВНА

**АНФОЛДИНГ И ФОЛДИНГ БЕЛКА ПО ДАННЫМ СВЕРХБЫСТРОЙ
КАЛОРИМЕТРИИ**

1.4.4. Физическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук, доцент
Мухаметзянов Тимур Анварович

Казань – 2023

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Литературный обзор.....	10
1.1 Процессы фолдинга/анфолдинга белков	10
1.1.1 Фолдинг белков.....	10
1.1.2 Денатурация белков.....	14
1.1.3 Обратимая и необратимая денатурация.....	15
1.1.4 Термодинамическое описание процессов фолдинга/анфолдинга.....	17
1.1.5 Кинетика процессов фолдинга/анфолдинга.....	20
1.2 Экспериментальные методы исследования процессов анфолдинга и фолдинга белков	21
1.2.1 Спектроскопические и структурные методы.....	21
1.2.2 Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	28
1.3. Современные методы калориметрии	37
1.3.1 Сверхбыстрая сканирующая калориметрия.....	37
1.3.2 Термомодулированная калориметрия.....	46
1.4 Лизоцим – модельный белок	49
Выводы по Главе 1	57
Глава 2. Экспериментальная часть.....	60
2.1 Материалы	60
2.2 Методы	61
2.2.1 Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	61
2.2.2 Сверхбыстрая калориметрия.....	61
2.2.3 Термомодулированная калориметрия со ступенчатым нагревом.....	63
2.2.4 Спектроскопия кругового дихроизма.....	63
2.2.5 ИК спектроскопия.....	63
2.2.6 Метод динамического светорассеяния.....	64
Глава 3. Результаты и обсуждение	65
3.1 Анализ необратимой денатурации модельного белка лизоцима методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния	65

3.1.1 Калориметрическое исследование необратимой денатурации лизоцима.....	65
3.1.2 Исследование необратимой денатурации лизоцима методами ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния.....	69
3.1.3 Механизм необратимой денатурации лизоцима.....	75
3.1.4 Кинетические параметры необратимой денатурации белка.....	79
3.2 Исследование процессов анфолдинга и фолдинга лизоцима с помощью сверхбыстрой калориметрии	86
3.2.1 Изотермический фолдинг лизоцима в глицерине.....	86
3.2.2 Механизм фолдинга лизоцима в глицерине.....	94
3.2.2. Анфолдинг лизоцима в глицерине по данным ТМДСК со ступенчатым нагревом.....	104
3.2.3. Анфолдинг лизоцима в воде по данным ТМДСК со ступенчатым нагревом.....	109
3.3 Математическое моделирование калориметрических кривых ТМДСК со ступенчатым нагревом.....	111
3.4 Сопоставление возможностей классического ДСК и сверхбыстрых калориметров в области исследования анфолдинга и фолдинга белков	119
3.4.1 ТМДСК со ступенчатым нагревом на классическом ДСК.....	119
3.4.2 Факторы, определяющие время отклика и отношение сигнал-шум калориметрических чип-сенсоров.....	127
Заключение.....	133
Список литературы	135

Введение

Актуальность работы. Область исследования термической стабильности белков находится на стыке научных сфер – биологии, химии, физики и представляет интерес как с прикладной, так и фундаментальной точек зрения. Выявление закономерностей между термодинамической и кинетической устойчивостью белков, их окружением и физическими параметрами внешней среды имеет большое значение для процессов очистки белков с сохранением их биологических свойств, при изготовлении фармацевтических препаратов, пищевых добавок, в медицине при использовании белков в качестве биомаркеров и т.д.

Под действием повышенных температур разрушается нативное состояние белка, то есть происходит денатурация, при этом могут протекать различные процессы – как обратимые, так и необратимые. Для описания процесса необратимой денатурации часто применяют схему Ламри-Эйринга, согласно которой на первой стадии происходит обратимое разворачивание белка, то есть анфолдинг, а на второй стадии реализуются необратимые процессы денатурации. При этом у многих белков равновесие анфолдинг/фолдинг устанавливается очень быстро, а процессы необратимой денатурации являются относительно медленными.

Существует много различных экспериментальных методов изучения белковых систем, среди которых важное место занимает сканирующая калориметрия. В области физической химии биомакромолекул дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) применяется для измерения температур и тепловых эффектов термической денатурации белков и нуклеиновых кислот, для оценки комплексообразования между биомакромолекулами и лигандами различной природы, исследования влияния среды на устойчивость биомолекул и т.д. В отличие от спектроскопических (ИК-спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма,

спектрофлуориметрия) и структурных методов (ЯМР и рентгеновская дифрактография) ДСК позволяет проводить прямое измерение тепловых эффектов, сопровождающих процессы конформационных изменений в белке.

Классические калориметры, применяемые для исследования термостабильности белков, осуществляют сканирование образцов со скоростями от 0,01 до 2 К/мин, позволяя определять термодинамические параметры быстрых процессов фолдинга/анфолдинга, тогда как изучение кинетики этих процессов требует реализации значительно более широкого диапазона скоростей сканирования. Кроме того, длительное время измерения благоприятствует протеканию медленных процессов необратимой денатурации. В этой связи представляет интерес реализация калориметрических измерений белков со значительно более высокими скоростями нагрева и охлаждения.

Необходимо отметить, что в настоящее время наблюдается интенсивное развитие методов сканирующей калориметрии. В последние годы важное значение приобрел, в частности, метод неадиабатической сканирующей чип-калориметрии (сверхбыстрая калориметрия), среди преимуществ которого – высокие скорости нагрева и охлаждения (до 10^6 К/с), а также крайне малые размеры образца. Получает распространение термомодулированная ДСК (ТМДСК), в том числе со ступенчатым сканированием. Последний метод интересен тем, что позволяет независимо оценить вклады в суммарный тепловой поток обратимого и необратимого тепловых эффектов, характеризующих поведение образца в рассматриваемом температурном диапазоне.

Однако приходится констатировать, что на сегодняшний день эти методы имеют очень ограниченное применение в области исследования белков, хотя потенциально они могут расширить существующие способы анализа биомакромолекул. Настоящая работа демонстрирует новые возможности методов сверхбыстрой калориметрии и термомодулированной калориметрии со ступенчатым нагревом для исследования процессов

анфолдинга и фолдинга белка.

Таким образом, **целью работы** является создание подходов для изучения быстрых процессов анфолдинга и фолдинга белков на основе сверхбыстрой и термомодулированной калориметрии.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Анализ необратимой денатурации модельного белка лизоцима методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния;

2. Изучение кинетики и механизма анфолдинга и фолдинга лизоцима методом сверхбыстрой калориметрии:

- 2.1. Изучение изотермического фолдинга лизоцима в глицерине;

- 2.2. Изучение анфолдинга лизоцима методом ступенчатого нагрева;

3. Математическое моделирование процесса анфолдинга белка в режиме ступенчатого нагрева для установления связи между кинетикой анфолдинга и формой калориметрических кривых в режиме ступенчатого нагрева;

4. Определение критериев применения сверхбыстрой калориметрии в области исследования процессов анфолдинга и фолдинга белков

Научная новизна:

- На основе анализа результатов дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния показано, что необратимая денатурация лизоцима при повышенных температурах вызвана протеканием процесса дезамидирования.

- На основе метода сверхбыстрой калориметрии впервые изучены кинетика и механизм процесса фолдинга лизоцима в глицерине. Определены кинетические параметры процесса (энергия активации, энтальпия и энтропия активации), влияние температуры на скорость фолдинга, предложена кинетическая схема процесса фолдинга, включающая интермедиат, изучены

свойства интермедиата фолдинга.

- На основе результатов математического моделирования процесса ступенчатого сканирования белка показано влияние кинетики процесса обратимого анфолдинга на форму калориметрических кривых со ступенчатым нагревом.

Теоретическая и практическая значимость.

Выполненная работа расширяет набор калориметрических подходов для исследования быстрых процессов анфолдинга/фолдинга белков. Подходы, предложенные в настоящей работе, могут быть использованы при исследовании термической стабильности белков и других биомакромолекул, как в рамках фундаментальных, так и прикладных исследований. Полученные в работе результаты демонстрируют, что современные калориметрические методы позволяют получать информацию не только о термодинамических параметрах быстрых процессов анфолдинга/фолдинга белка, но могут быть использованы и для анализа кинетики этих процессов. Кинетические закономерности фолдинга лизоцима в глицерине могут быть использованы для оптимизации процессов выделения и очистки белков.

Методология и методы исследования.

Поставленные в работе задачи решались набором физико-химических методов исследования. Для регистрации калориметрических кривых использовали капиллярный дифференциальный сканирующий калориметр TA Instruments nanoDSC (США), кривые методом сверхбыстрой калориметрии получали на калориметрах Mettler Toledo FlashDSC1 и FlashDSC2+ (Швейцария), а также Spark IV (Германия) с использованием калориметрических чип-сенсоров UFS1 и жидкостных сенсоров NanoLiq Xen-39400. Инфракрасные спектры получали на Фурье ИК-спектрометре Bruker Vertex 70 (Германия), спектры кругового дихроизма получали на КД-спектрометре Jasco J-1500 (Япония). Информацию о размере частиц в растворе получали с помощью анализатора размера частиц и ξ -потенциала Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания).

Расчет теоретических кривых термомодуляционной ДСК со ступенчатым нагревом для процесса денатурации белка проводили методом численного интегрирования. Анализ кривых термомодуляционной ДСК в режиме ступенчатого нагрева проводили методом Фурье преобразования с помощью специально написанной программы.

Основные положения, выносимые на защиту:

Установлен механизм необратимой денатурации лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО при повышенных температурах (выше 75°C). Показано, что в результате денатурации образуются формы белка с пониженной термической стабильностью, но конформацией, близкой к нативной. Определены кинетические параметры процесса.

Разработан калориметрический подход на основе сверхбыстрой калориметрии для изучения кинетики фолдинга лизоцима в глицерине.

Определены кинетические параметры процесса фолдинга лизоцима в глицерине, предложена кинетическая схема фолдинга лизоцима в глицерине.

На основе результатов математического моделирования процесса анфолдинга в ходе ступенчатого сканирования показана связь между кинетикой обратимого анфолдинга и формой калориметрических кривых ступенчатого нагрева.

Реализация ступенчатого нагрева на классических ДСК и сверхбыстрых калориметрах позволяет улучшить качество экспериментальных данных и реализовать квазиравновесный режим нагрева на сверхбыстром калориметре.

Личный вклад автора. Автором получены все экспериментальные данные, представленные в работе; проведен анализ литературы, математическая обработка экспериментальных данных; выполнено обобщение полученных результатов.

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет» при поддержке гранта РФФИ по

проекту № 20-34-90140 по теме «Термостабильность белка по данным мультимодальной термомодулированной калориметрии», гранта МинОбрНауки РФ № 14.Y26.31.0019, программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на Международной конференции СЕЕС-ТАС2017 (Рим, Италия, 2017), Международной конференции СЕЕС-ТАС&Medicta 2019 (Рим, Италия, 2019), IV Международной конференции 4th Flash DSC Conference 2019 (Цюрих, Швейцария, 2019), XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2021), XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2022), XXIII Международной конференции по химической термодинамике в России RCST-2022 (Казань, Россия, 2022), Итоговой научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава института физики и Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ (Казань, Россия, 2023).

Публикации. Основные результаты диссертационного исследования изложены в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в WoS и Scopus, а также в 6 тезисах докладов на международных научных конференциях. Все публикации по теме диссертации написаны в соавторстве с научным руководителем Мухаметзяновым Т.А. (к.х.н., доцент кафедры физической химии Химического института им. А.М.Бутлерова).

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Процессы фолдинга/анфолдинга белков

1.1.1 Фолдинг белков

Белки выполняют ключевую роль во всех биологических процессах [1–3], они катализируют бесчисленное множество реакций, тем самым обеспечивая функционирование живых организмов.

Свои каталитические, транспортные, структурные функции белки могут выполнять за счет того, что организованы в уникальную нативную структуру, которая формируется уже в ходе синтеза белка на рибосоме. Интерес к исследованию факторов, определяющих нативную структуру и поддерживавших ее стабильность, имеет как практическую составляющую, связанную с проблемами медицины и биотехнологии, так и фундаментальную, поскольку белки являются одним из ключевых элементов живых организмов.

В живой клетке синтез белка протекает в два этапа. На первом этапе в ядре клетки происходит транскрипция – информация о последовательности кодируемого белка переносится с участка двойной спирали ДНК на и-РНК в соответствии с принципом комплементарности, синтезируется молекула и-РНК. Следующий этап – трансляция – начинается после перехода молекулы и-РНК в цитоплазму. Нуклеотидная последовательность молекулы и-РНК преобразуется в последовательность аминокислот, соединенных амидными – С(О)-N(Н)- связями. Синтезируемая таким образом полипептидная цепь еще не имеет нативной структуры, но вскоре сворачивается в компактное нативное состояние. Процесс формирования упорядоченной нативной структуры из неорганизованной называется фолдингом (сворачиванием) белка.

Анфинсен показал, что в окружении, близком по свойствам к физиологическим условиям, формирование нативной структуры – это самопроизвольный термодинамически выгодный процесс [4]. Таким образом, переход полностью развернутой белковой молекулы в нативное состояние связан уменьшением свободной энергии молекулы [5,6]. Такой процесс часто

представляют в виде воронки (Рисунок 1), где зона с максимальной энергией соответствует полностью развернутому состоянию, а по мере снижения энергии системы белок приобретает все более выраженную нативную структуру через образование промежуточных продуктов фолдинга, обозначенных локальными минимумами.

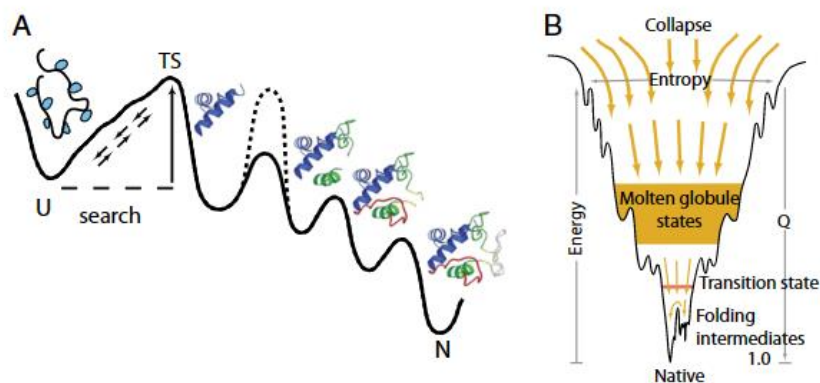


Рисунок 1 – Классическое представление о пути фолдинга белка: многостадийный механизм фолдинга (слева) в соответствии с воронкообразной моделью потенциальной энергии (справа). Эффективная энергия отложена по вертикали, энтропия – по горизонтали [7].

Число возможных конформаций для полипептидной цепи чрезвычайно велико и, случайный поиск энергетически наиболее выгодной конформации занял бы время, большее чем возраст Вселенной (~13,8 млрд лет, оценка получена произведением времени вращения вокруг одиночной связи на число доступных конфигураций полипептидной цепи белка средних размеров), в то время как в действительности сворачивание белков происходит в биологически значимом временном масштабе (обычно от 10^{-6} до 10^{-3} с). Такое противоречие привело Левинтала в 1958 году к выводу о существовании определенного пути фолдинга [2].

Со временем сложился консенсус о так называемой «проблеме фолдинга белка», в которой выделяют три аспекта: [8]: (а) изучение физических сил, которые определяют трехмерную структуру белка, (б) выявление причин невероятно высокой скорости сворачивания, (в) предсказание структуры белка на основе аминокислотной последовательности.

В области теоретического предсказания нативной структуры по первичной последовательности в последние годы достигнут огромный прогресс. Современные вычислительные методы позволяют предсказывать трехмерную структуру белков с большой степенью достоверности [9]. Однако понимание того, почему белки сворачиваются с невероятной скоростью, и какие физические силы лежат в основе трехмерной структуры белка, в полной мере еще не достигнуто [10]. Отчасти это связано с трудностями экспериментального наблюдения процесса фолдинга, а также моделирования состояния белка в ходе его сворачивания, вызванными большими размерами молекулы. Процесс фолдинга – относительно быстрый процесс, который протекает во временном масштабе порядка миллисекунд (10^{-3} с) [11], что затрудняет использование типичных методов, используемых для изучения структуры и состояния белков, хотя арсенал экспериментальных подходов к изучению механизмов сворачивания белка постоянно расширяется [12].

Основной прогресс в области изучения сил, определяющих устойчивость нативной структуры белка, достигнут в 70-90-е годы XX века. Общепринято, что «информация» об особенностях трехмерной нативной структуры белка закладывается в первичной аминокислотной последовательности [5] и процесс фолдинга спонтанно активируется при помещении белка в «нативную» среду [13]. Экспериментально показано, что наибольший вклад в стабилизацию нативной структуры вносят гидрофобные взаимодействия и межмолекулярные водородные связи [14]. Менее значимый вклад в стабильность третичной структуры белков наблюдается от дисульфидных связей, электростатических взаимодействий, «солевых мостиков», а также $n - \pi^*$ взаимодействий между карбонильными группами. Исследование состояния белка в неводных средах позволило обнаружить быструю денатурацию в неполярных растворителях [15] и установить ключевую роль воды в стабилизации нативной структуры [16].

Количественный вклад гидрофобных и гидрофильных взаимодействий в термодинамические свойства нативной структуры невозможно определить

напрямую – для оценки их роли изучают влияние параметров окружения на стабильность белка [17]. Так, величины изменения теплоемкости и энтропии белковой глобулы в ходе термической денатурации связывают с доступной поверхностью (ASA – accessible surface area) белка [18]. Путем наблюдения за взаимодействиями молекулы белка с растворителем исследуют механизм денатурирующего воздействия различных факторов, таких как температура, рН, денатурирующие добавки.

В связи со сложностью практического наблюдения процессов денатурации и фолдинга, немалый интерес привлекают работы в области компьютерного моделирования этих процессов [19]. Для малых быстросворачивающихся белков проводится сравнение экспериментальных результатов анализа фолдинга с теоретическими [20], что позволяет дать заключение о более вероятных механизмах процесса сворачивания. Денатурированный белок, как правило, состоит из совокупности структур, которые нередко оказываются почти такими же компактными, как и нативные молекулы (Рисунок 2). Такие структуры очень сложно различить как

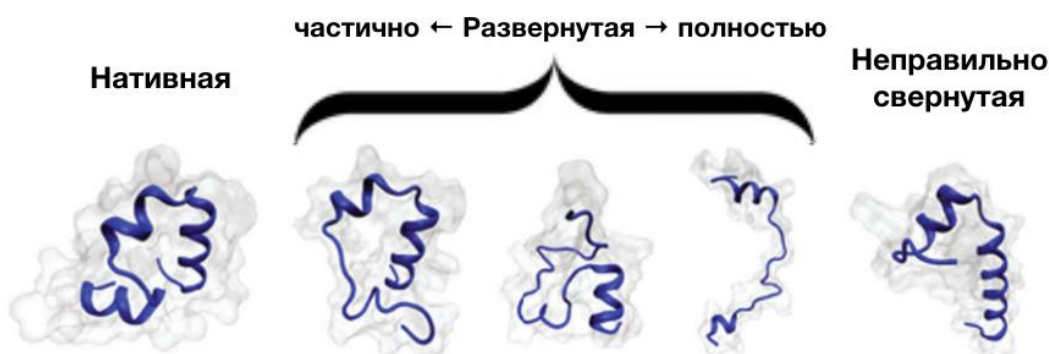


Рисунок 2 – Различные конформации фрагмента виллина, полученные путем моделирования. Слева – нативная структура, посередине – три развернутые структуры, из которых первые две напоминают по компактности нативную молекулу, третья представляет собой структуру, полностью лишенную вторичной упаковки, и крайняя структура справа – неправильно свернутая, образовавшаяся вне пути фолдинга [20].

экспериментально, так и применяя вычислительные методики. В то же время, моделирование фолдинга крупных белков методом молекулярной динамики

оказывается затруднительным из-за огромных вычислительных затрат, хотя и в этой области наблюдается некоторый прогресс [21–23]. Осуществлялись попытки создания искусственных систем, подобных белкам (характеризующихся только двумя макроскопическими состояниями), и в нескольких случаях удавалось реализовать процесс формирования глобулы из макромолекулы [24].

Изучение механизмов фолдинга остается одной из важнейших фундаментальных задач в науке [25]; по данным базы Scopus, несмотря на некоторое снижение публикационной активности по сравнению с пиком, пришедшимся на 2009 год, число публикаций в этой области остается высоким (порядка 2000 публикаций в год). Некоторое падение интереса исследователей к проблеме фолдинга белка может являться симптомом исчерпания возможностей традиционных экспериментальных подходов, в связи с этим особенно актуальна разработка новых методик, позволяющих наблюдать за состоянием белка в процессе фолдинга. Недостаток экспериментальной информации об энергетических ландшафтах фолдинга был отмечен как главная нерешенная проблема в области исследований фолдинга белка [8].

1.1.2 Денатурация белков

Изменение структуры белка, приводящее к потере биологической активности, называют денатурацией. Считается, что основным этапом денатурации является разрушение третичной структуры белка [26]. Вторичная структура денатурированного белка может в большей или меньшей степени сохраняться; в целом структура денатурированного состояния сильно зависит от условий окружения (рН, ионной силы раствора, температуры), при которых протекает переход. Процесс денатурации может включать и химическую модификацию белковой молекулы [27].

Важно отметить, что свойства денатурированного белка (т.е. имеющего ненативную структуру и не демонстрирующего нативные функциональные

свойства) не обязательно идентичны бесструктурному случайному клубку [26]. Процесс, при котором образуется т.н. случайный клубок, называется анфолдингом белка. Вместе с тем белок в состоянии случайного клубка уже не проявляет нативной биологической активности, поэтому анфолдинг является одним из видов денатурации.

Исследование денатурации способствует получению информации о природе сил, поддерживающих нативную третичную структуру, расширению знаний о свойствах и функциях белков [28]. Знание механизма, условий протекания и контролирование процесса денатурации имеет важное значение в обработке и производстве пищевых продуктов, при получении ПАВ, клеев, покрытий, пластмасс на биологической основе [29].

Процесс получения чистого белка зачастую включает стадии, на которых белок денатурирует. При этом для лабораторных исследований, пищевой промышленности и фармации [30] очень важно сохранить трехмерную структуру белка вместе с его уникальной функциональностью, поэтому технологические процессы выделения белка должны включать стадии, на которых белок восстанавливает нативную структуру. В связи с этим изучение процессов анфолдинга (разворачивания) и фолдинга (сворачивания) белков представляет практический интерес, поскольку позволяет оптимизировать процессы выделения и очистки различных белков.

Таким образом, исследование закономерностей процесса денатурации белков имеет и прикладное, и фундаментальное значение.

1.1.3 Обратимая и необратимая денатурация

Протекание процесса денатурации обусловлено окружением белка, внешними параметрами, и может происходить как в обратимом, так и в необратимом режиме.

Денатурированный белок, в котором последовательность аминокислот в полипептидной цепи не нарушена, способен полностью восстанавливать

нативную трехмерную структуру (с восстановлением всех дисульфидных связей), и впервые такая возможность была показана для молекулы рибонуклеазы [31]. На основе дальнейших исследований Анфинсеном была сформулирована термодинамическая гипотеза, предполагающая, что трехмерная нативная структура белка в физиологических условиях будет характеризоваться минимальным значением свободной энергии Гиббса всей системы. Под физиологическими (нативными) условиями принято понимать определенные значения таких параметров системы как растворитель, pH, ионная сила, присутствие других компонентов, температура и т.д.

В соответствии с термодинамической гипотезой Анфинсена [32], когда белок вводится в нативную среду из денатурирующих условий, он спонтанно восстанавливает свое нативное состояние, то есть денатурация должна быть обратимой. Однако агрегация или химическая денатурация белковых молекул в денатурирующей среде может помешать белку вернуться в нативное состояние [27,33–35]. Такие процессы обычно описываются в рамках двухстадийной модели необратимой денатурации белка Ламри-Эйринга [36–38]. В рамках этой модели денатурацию рассматривают как протекание, по меньшей мере, двух процессов: 1) обратимого анфолдинга нативной формы белка (N) и 2) необратимый переход развернутой структуры (U – unfolded) в конечное денатурированное состояние (D). Такой процесс записывается в форме кинетической схемы: $N \rightleftharpoons U \rightarrow D$.

Предполагается, что первая обратимая стадия в модели Ламри-Эйринга связана с конформационными переходами, вызванными повышением температуры. Вторая необратимая стадия начинает протекать в результате длительной инкубации при температуре перехода $N \rightleftharpoons U$, либо при более высоких температурах. Исследование необратимой денатурации позволило установить, что ее главными причинами оказываются такие реакции, как дезамидирование остатков аспарагина, гидролиз пептидной связи на месте остатков аспарагиновой кислоты, разрыв дисульфидных связей, а также

агрегация молекул, протекающие при повышенной температуре [27,39]. Для многих белков тепловая денатурация оказывается необратимой [37].

Возможными способами наблюдения за обратимостью денатурации (т.е. способностью белка восстанавливать свою структуру и активность) являются эксперименты с разбавлением денатурирующей среды водой [40], осуществление последовательных циклов нагрев-охлаждение [41,42], либо комбинированное воздействие [43,44]. Актуальной задачей является поиск условий для осуществления обратимой денатурации. Было показано, что денатурация может быть обратимой даже после нагревания до 120°C, если нативный белок подвергнуть реакции иммобилизации [45].

Изучение обратимости денатурации представляет интерес, позволяя подбирать условия, при которых белки будут обладать большей или меньшей степенью стабильности. При этом нужно отметить, что первая стадия механизма Ламри-Эйринга – обратимый анфолдинг белка – может быть проанализирована в рамках термодинамического подхода для получения информации о равновесных параметрах процессов анфолдинга или фолдинга.

1.1.4 Термодинамическое описание процессов фолдинга/анфолдинга

В случае, если процесс денатурации включает только изменения конформации белка и происходит термодинамически обратимо, его можно описать в рамках классической либо статистической термодинамики. В простейшем случае процесс анфолдинга/фолдинга можно описать как термодинамически равновесный процесс перехода между двумя состояниями $U \rightleftharpoons F$. В уравнении денатурированная развернутая форма белка обозначается символом U (unfolded), нативная свернутая структура как F (folded). В такой системе можно выделить два энергетических уровня белковых молекул – уровень F с наиболее низкой энергией, характеризующийся малым числом вырожденных состояний и уровень U – высокоэнергетический уровень с большим числом различных макросостояний [46]. Константа равновесия для

процесса перехода между нативной и развернутой формами определяется отношением долей свернутой и денатурированной форм, и зависит от внешних условий:

$$K^{\text{равн}} = \frac{q_F}{q_U} = \exp[-\beta(\mu_F^* - \mu_U^*)]$$

μ^* – химические потенциалы свернутой (N) и развернутой (D) форм белка;

β – коэффициент равный произведению константы Больцмана на абсолютную температуру (T): $\beta = k_b T$;

q_F и q_U – доли «свернутых» и «развернутых» молекул белка соответственно.

Зависимость константы равновесия от температуры выражается уравнением:

$$K^{\text{равн}} = \exp[-\beta(\Delta E^\circ - T\Delta S^\circ)] = \exp\left[-\left(\frac{\Delta E^\circ}{k_b T} + \frac{\Delta S^\circ}{k_b}\right)\right]$$

где ΔE° - разность стандартных энергий двух состояний системы;

ΔS° - разность стандартных энтропий двух состояний системы,

из которого следует, что с ростом температуры величина константы равновесия будет стремиться к нулю, также, как и численность молекул, имеющих свернутую конформацию. И наоборот, при низкой температуре молекулы белка будут предпочтительно принимать состояние с низкой энергией (F). Таким образом, если известны заселенности состояний белка как функции температуры, то могут быть оценены равновесные термодинамические параметры процесса фолдинга.

Одним из важнейших параметров, получаемых при изучении термической денатурации в рамках одностадийной обратимой модели, является температура плавления белка (T_m), при которой заселенности высокого и низкого энергетических уровней выравниваются (температура перехода между состояниями U и F). Нужно отметить, что с точки зрения

классической термодинамики процессы фолдинга и анфолдинга не являются фазовыми переходами первого рода, поэтому применение термина «плавление» к таким процессам является достаточно условным.

Для многих белков была обнаружена склонность к протеканию денатурации не только в ходе нагрева, но и при охлаждении [47]. Обнаружено, что вследствие значительной разности теплоемкостей между состояниями белка величина изменения энтальпии меняет знак, и процесс холодной денатурации протекает с экзотермическим эффектом. Научной группой Привалова П.Л. были получены ДСК кривые процессов тепловой и холодной денатурации для белка метмиоглобина [48].

Помимо термического воздействия, обратимую денатурацию может вызывать высушивание (в том числе добавление спиртов), повышенное давление, встряхивание, воздействие ультразвуковых волн, добавление кислот и щелочей, мочевины, солей тяжелых металлов и других денатурирующих агентов [49]. В стандартных условиях, когда температура ниже плавления, термодинамическое равновесие $N \leftrightarrow U$ оказывается смещенным к нативному состоянию, и добавление денатурирующих веществ приводит к снижению величины энергии Гиббса прямого процесса разворачивания белка $\Delta G_{N \rightarrow U}$ и предпочтительному протеканию денатурации. При попытках объяснить причины такого поведения системы возникают разногласия – связана ли денатурация со взаимодействием белковой молекулы непосредственно с денатурирующим веществом или же с тем, что меняется упорядоченность молекул воды в окружении белка. Необходимо учитывать оба процесса при изучении денатурации [50].

Важной проблемой является установление достоверных значений термодинамических параметров процесса фолдинга белка, что требует точной оценки вкладов обратимых и необратимых процессов в ходе денатурации.

1.1.5 Кинетика процессов фолдинга/анфолдинга

Первые экспериментальные исследования кинетики фолдинга были предприняты во второй половине 60-х годов XX века. Было показано, что кинетика фолдинга α -химотрипсина может быть описана как одностадийная реакция первого порядка [51], а в случае нуклеазы стафилококка фолдинг включает две последовательных стадии первого порядка [52].

Для описания кинетики фолдинга рибонуклеазы А была предложена последовательная кинетическая схема, включающая начальную стадию нуклеации [53], причем было показано, что даже в случае существования значительного числа интермедиатов фолдинга процесс в некоторых случаях может быть описан как одностадийная реакция.

Развитие экспериментальных методик позволило исследовать кинетику фолдинга в субмиллисекундном разрешении. В частности, было обнаружено, что фолдинг цитохрома С на начальном этапе включает быструю стадию (~50 мкс), скорость которой не зависит от начальных условий и состояния гема белка [54].

К настоящему времени накоплен большой объем экспериментальных результатов по кинетике фолдинга белка [55,56]. Чаще всего результаты анализируются в рамках модели двух состояний (одностадийная модель) или трех состояний (модель с интермедиатом) [57,58].

Замечателен тот факт, что несмотря на огромное число доступных конформаций молекулы белка, экспериментальные наблюдения фолдинга сводятся к достаточно простым кинетическим моделям. Для объяснения этого наблюдения были предложены различные подходы.

Цванциг показал [59], что если в ансамбле состояний белка можно выделить достаточно определенное свернутое (нативное) состояние и большой набор несвернутых состояний, каждое из которых вносит лишь небольшой вклад в общую функцию распределения, то процесс фолдинга будет описываться кинетической моделью, которая идентична модели двух

состояний. Шонбрун и Дилл [60] предложили рассматривать процесс фолдинга не в рамках теории переходного состояния, где выделяются развернутое и свернутое состояния, разделенные энергетическим барьером, а в рамках модели параллельного фолдинга из множества несвернутых состояний. В дальнейшем Роллинс и Дилл предложили рассматривать энергетическую поверхность фолдинга как «вулкан» [61], то есть энергетический минимум, соответствующий свернутому (нативному) состоянию, окруженный широким барьером с пологими внешними и крутыми внутренними стенками. Вместе с тем для некоторых небольших белков предложен так называемый безбарьерный механизм фолдинга [62], в котором развернутое и нативное состояния не разделены барьером, а энергетическая диаграмма, описывающая их свойства, плавно смещается при изменении внешних условий. При этом, в зависимости от внешних условий механизм фолдинга может меняться от безбарьерного (некооперативного) к кооперативному (с барьером) [63].

Необходимо отметить, что свойства ансамбля неравновесных состояний белка, существующих в процессе сворачивания, до сих пор изучались только спектральными и структурными методами. Ниже будут рассмотрены экспериментальные методы, позволяющие исследовать состояние белка, и показано особое значение сканирующей калориметрии, с помощью которой можно непосредственно измерять тепловые эффекты процессов анфолдинга и фолдинга.

1.2 Экспериментальные методы исследования процессов анфолдинга и фолдинга белков

1.2.1 Спектроскопические и структурные методы

Функциональные свойства белков обеспечиваются наличием определенных аминокислотных остатков в боковой цепи, в связи с чем анализ первичной структуры белков имеет большое значение. Состав полипептидной

цепи в некоторой степени можно установить, используя ИК спектроскопию [64]. Существуют обширные таблицы для определения аминокислотных остатков по полосам поглощения на частотах, соответствующих колебаниям отдельных групп атомов. Такой анализ позволяет определить активные центры в молекуле. Однако в настоящее время, в связи с доступностью методик быстрого секвенирования белков [65], этот подход отошел на второй план.

Значительно более актуальным является конформационный анализ белков на основе ИК-спектроскопии. Этот метод в первую очередь дает информацию о вторичной структуре белков. В нативном белке водородные связи, образованные внутримолекулярными амидными группами, меняют положение и форму интенсивных полос поглощения Амид-I ($\sim 1600 - 1700 \text{ см}^{-1}$) и Амид-II ($\sim 1550 \text{ см}^{-1}$). Эти полосы поглощения соответствуют валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$ связи и деформационным колебаниям связи $\text{N}-\text{H}$ амидных (пептидных) групп белка и являются характеристическими для компонентов вторичной структуры белка (Рисунок 3). Сложностью при наблюдении за состоянием вторичной структуры белка в водных растворах является то, что молекулы воды имеют интенсивную полосу поглощения, перекрывающую полосу поглощения Амид-I белка, поэтому обычно спектры белка получают в растворах на основе тяжелой воды.

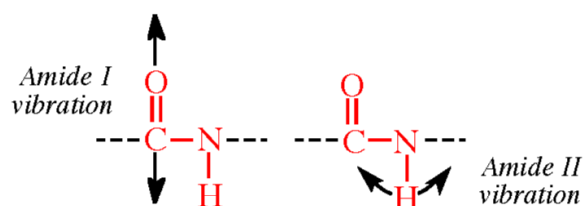


Рисунок 3 – Колебания, ответственные за полосы поглощения Амид-I и Амид-II [66].

Другой подход, основанный на ИК-спектроскопии, связан с процессом изотопного обмена. В полностью развернутом белке атомы азота пептидной группы и атомы кислорода молекул воды растворителя будут интенсивно

обмениваться протонами. Наоборот, для свернутого нативного белка интенсивность протонного обмена будет минимальной, и производится только за счет поверхностных амидных групп. Такая особенность различной частоты колебания связей при обмене атомов ^1H на ^2H позволяет использовать методику изотопного обмена в ИК-спектроскопии для изучения процессов анфолдинга, фолдинга и агрегации [66].

Также значение имеет Рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния). Как и ИК-спектроскопия, этот метод детектирует колебания различных функциональных групп молекулы белка [67] и может быть использован для наблюдения за состоянием вторичной структуры белка. Достоинством метода является то, что вода не дает значительного сигнала в области колебаний пептидной группы в спектрах комбинационного рассеяния, при этом методика менее распространена в связи с тем, что для регистрации спектров образец облучают интенсивным излучением в УФ либо видимом диапазоне, что может не подходить для некоторых белковых образцов.

Другим важным методом исследования вторичной и третичной структур белка является спектроскопия кругового дихроизма (КД) [68]. На КД спектрометре регистрируется разность интенсивностей лучей с противоположной круговой поляризацией – эллиптичность. Отклонение значения эллиптичности от нулевого значения свидетельствует о наличии хиральных участков в молекуле. В белках хиральными, то есть оптически активными, участками выступают атомы углерода с четырьмя различными заместителями, атомы углерода при дисульфидной связи, а также хромофоры (ненасыщенные группы атомов), расположенные в асимметричном окружении, либо ковалентно связанные с хиральной группой.

Чувствительность сигнала КД к наличию элементов вторичной и третичной структур связана с высокой интенсивностью поглощения пептидных связей (до 240 нм), дисульфидных связей (слабый широкий сигнал около 260 нм) и ароматических остатков аминокислот (~ 260-320 нм) в

молекулах нативного белка. К примеру, белки с развитой трехмерной структурой имеют отрицательную полосу в спектре КД между 222 и 208 нм, и положительную полосу при 195 нм (Рисунок 4). Существуют различные расчетные методы, которые позволяют установить относительное содержание элементов вторичной структуры по спектру КД в дальней УФ области, а также программные пакеты для такого расчета. Возможность расчета содержания элементов вторичной структуры на основе спектров КД представляет сайт Dichroweb [69].

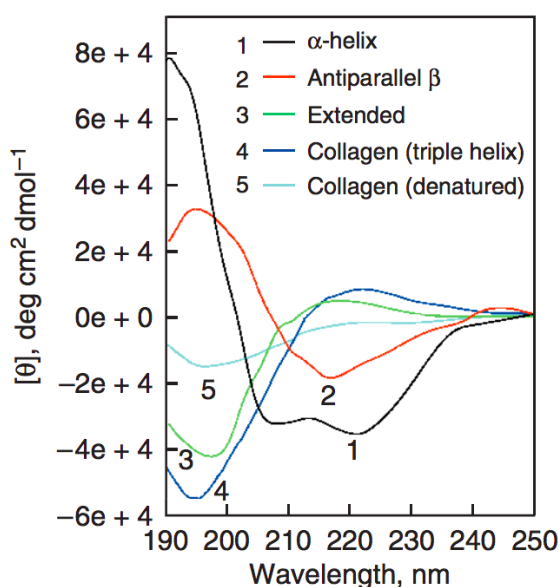


Рисунок 4 – КД спектры поли-L-лизина с различной конформацией: (1) – α -спираль, (2) – структура, состоящая преимущественно из β -листов; (3) – развернутая конформация; КД спектры коллагена (4) – нативной формы коллагена, и (5) – денатурированного коллагена [70].

Состояние третичной структуры белков распознают по полосам поглощения остатков ароматических аминокислот на спектрах КД. В ближней УФ области отчетливый сигнал дают остатки триптофана (~ 290 нм), тирозина (275-282 нм), фенилаланина (широкая полоса на 255-270 нм). Положение перечисленных аминокислотных остатков меняется при переходе белка между нативным и полностью денатурированным состояниями, что позволяет получать информацию о третичной структуре белков.

Для исследования структуры белков применяют флуоресцентные методики. В первую очередь фиксируются спектры флуоресценции (преимущественно эмиссии), связанные с излучением ароматических групп в боковой цепи полипептида. Спектры флуоресценции для нативной и денатурированной форм белка значительно отличаются (Рисунок 5), поэтому, анализируя интенсивность в спектре флуоресценции полосы, соответствующей определенной аминокислотной группе боковой цепи, можно наблюдать за процессами анфолдинга и рефолдинга [71].

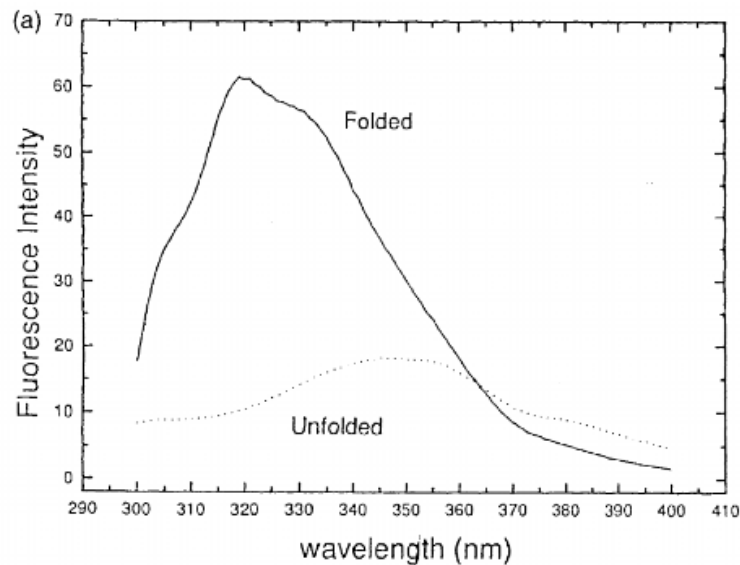


Рисунок 5 – Спектры собственной флуоресценции (эмиссии) нативной и денатурированной (в 8М растворе мочевины) рибонуклеазы T1 с возбуждением на 278 нм [72].

Метод флуоресценции часто применяют для наблюдения за химической денатурацией, поскольку он не требует высоких концентраций белка. Однако применение флуоресценции для исследования термического анфолдинга затруднено, поскольку интенсивность полосы испускания зависит от температуры [73].

Расшифровать структуру белковой молекулы на уровне отдельных атомов позволяет техника ядерного магнитного резонанса [74]. С ее помощью можно фиксировать конформационные переходы белковой молекулы, получать информацию о ее гибкости, а также оценивать межмолекулярные взаимодействия [75]. Протоны амидных связей и протоны (связанные с α -

атомами углерода аминокислот) в составе спиральных элементов белковой структуры демонстрируют смещение сигнала ЯМР ^1H в область сильного поля [76]. Наоборот, протоны в составе β -структур или в развернутом белке демонстрируют смещение в сторону слабого магнитного поля. Нередко используются более селективные гетероядерные методики ЯМР ^{13}C , ^{15}N , что позволяет получить детальную информацию о подвижности белковой молекулы. Химический сдвиг, который наблюдают на спектрах ЯМР, крайне чувствителен к окружению ядер и, следовательно, к любым изменениям конформации молекулы. Однако однозначная интерпретация спектров ЯМР белков является весьма сложной задачей – кроме того, концентрация белка и чистота образца должны быть достаточно высокими для исключения помех.

Первые экспериментальные наблюдения кинетики фолдинга были достигнуты с применением спектроскопических методов, таких как спектроскопия кругового дихроизма, флуориметрия [77], ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием [78], ЯМР [79], Рамановская спектроскопия [80]. Они позволили наблюдать за процессом сворачивания белка в нативную третичную структуру. В этих методиках процесс фолдинга часто инициируется путем разбавления раствора белка, находящегося в денатурирующей среде, водой или подходящим буфером. Таким образом, окружение белковых молекул быстро меняется с денатурирующего на нативное, поскольку нативное состояние оказывается термодинамически более выгодным, и образование неравновесного белкового ансамбля в ходе формирования нативной структуры можно наблюдать подходящими спектроскопическими методами. Анализ изменения спектров белка во времени позволяет определять кинетические параметры процесса фолдинга и даже обнаруживать значимые промежуточные продукты, если они формируются в ходе повторного фолдинга.

Спектроскопическое наблюдение за процессом анфолдинга можно вести при нагревании. Скорость нагрева, которую можно реализовать с помощью обычных методов, ограничена, поэтому такие исследования ведутся в

условиях, близких к обратимым. Если с помощью спектральных методов удастся определить равновесное содержание нативной и развернутой форм белка как функции температуры, то можно рассчитать термодинамические параметры процессов анфолдинга/фолдинга. Более того, в литературе были описаны подходы, позволившие рассчитать разность теплоемкостей нативной и развёрнутой форм белка по спектральным данным на основании метода Вант-Гоффа и других методов [81,82]. Необходимо отметить, что эти параметры достоверны только в случае термодинамически обратимого разворачивания. Поскольку результаты спектроскопического анализа ограничиваются типом воспринимаемого сигнала и относятся к конкретным функциональным группам либо заместителям, а не всей молекуле в целом, в некоторых случаях наблюдается рассогласование между результатами спектральных методов [83], которое может означать наличие стабильных интермедиатов.

Также получили развитие методы температурного скачка, в которых быстрое изменение температуры запускает процессы анфолдинга или фолдинга, что позволяет исследовать их кинетику [78,84–86]. К примеру, кинетику формирования β -структур в ходе повторного сворачивания рибонуклеазы А удавалось изучать по изменениям в ИК-спектре, наблюдавшимся после помещения образца белка, предварительно выдержанного при 80°C (выше температуры анфолдинга), в термостатируемую ячейку при 20°C [78]. Предположено синхронное формирование β -структур, которое свидетельствует о кооперативном сворачивании белка.

Применение методики быстрого смешения предварительно нагретого раствора белка с холодным буферным раствором [84] и обратной процедуры позволило наблюдать за фолдингом цитохрома С по данным сигнала флуоресценции. Анализ влияния длительности выдерживания белка при повышенной температуре на интенсивность полосы в спектре указывает на протекание необратимых изменений с увеличением продолжительности

высокотемпературной инкубации. Необратимые процессы, в числе которых могут быть химическая модификация и агрегация белка, препятствуют сворачиванию.

Продемонстрированы возможности масс-спектрометрии для исследования кинетики процессов анфолдинга и фолдинга биомолекул [87]. Реализация температурного скачка величиной до 50°C за счет прохождения образца ДНК через специально оборудованные разнотемпературные блоки и регистрация масс спектра образца позволили определить энергию Гиббса образования двух- и трехцепочечной ДНК, оценить энергии активации и предположить различные механизмы процессов.

Следует отметить, что термодинамические параметры (в частности энтальпия) процессов анфолдинга/фолдина, рассчитанные по спектральным данным, являются априори модельными. Прямое измерение энтальпии разворачивания и сворачивания белка, а также теплоемкости его различных форм, можно осуществить методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Более того, применение спектроскопических методов возможно, только если исследуемый объект имеет подходящие характеристики, в частности в изучаемом спектральном диапазоне отсутствует значительное светорассеяние, поглощение растворителя или буферных солей, что необходимо учитывать при планировании эксперимента. Отсутствие этих ограничений в ДСК позволило, например, исследовать термическую денатурацию белков напрямую в живой клетке [88].

1.2.2 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Для физических процессов и химических реакций, протекание которых связано с выделением или поглощением тепла, метод ДСК является универсальным методом анализа, поскольку позволяет определять такие важные характеристики, как теплоту фазового перехода или химической реакции, температуру пика, теплоемкость фазовых состояний вещества, термическую стабильность. Наличие пиков на кривой ДСК свидетельствует о

протекании процессов выделения или поглощения тепла исследуемой системой. Нужно подчеркнуть, что калориметрия является интегральным методом, и регистрирует тепловые эффекты любых процессов, протекающих в системе. В этом заключается как преимущество, так и недостаток калориметрии, по сравнению со спектральными методами, которые обычно несут информацию о состоянии каких-то конкретных элементов системы и не реагируют на другие изменения.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии произошел от дифференциального термического анализа [89], позволившего впервые получить точную оценку температур кристаллизации и плавления по изменению температуры образца, регистрируемой в ходе нагрева или охлаждения. В середине XX века впервые был сконструирован прибор, в котором измеряется температура не самого образца, а разность температур двух ячеек, содержащих исследуемый образец и эталонное вещество, что значительно повысило чувствительность метода. Первый дифференциальный сканирующий калориметр в современном понимании, с отдельными нагревательными элементами для двух ячеек и компенсацией мощности был представлен в 1962 году компанией PerkinElmer (США).

Дифференциальная сканирующая калориметрия широко используется при мониторинге термической денатурации (анфолдинга) и фолдинга белков [37,90–94]. В основе метода лежит измерение разности температур между измерительной ячейкой с белковым раствором и эталонной ячейкой, заполненной растворителем. При повышении температуры происходит поглощение тепла в ячейке с белком, создается разность температур. Для того чтобы разность температур в ячейках оставалась постоянной, на образец с белком подается дополнительная мощность (если процесс денатурации эндотермический), и наоборот, осуществляется отвод тепла, если в системе протекает экзотермический процесс. Избыточная мощность регистрируется в виде калориметрической кривой и несет информацию об изменении теплоемкости белка. На кривых избыточной теплоемкости белковых

растворов могут наблюдаться эндотермические пики в ходе нагрева. Наличие теплового эффекта на кривой ДСК белков означает переход исходного (нативного) состояние в некоторое новое, отличающееся по энтальпии. После вычитания базовой линии (необходимость определения базового сигнала калориметра возникает из-за наличия асимметрии между ячейками) и нормирования площади пика на концентрацию образца, можно определить молярную энтальпию процесса и определить температуру пика денатурации [91,95,96]. Таким образом, наличие пика на кривой ДСК однозначно указывает на протекание денатурации, для установления механизма которой, вместе с тем, требуется тщательный анализ.

Площадь пика теплопоглощения называют калориметрической энтальпией процесса денатурации, $\Delta_N^U H^{cal} = H^U - H^N$. Предполагая, что наблюдаемый тепловой эффект является результатом простого одностадийного обратимого перехода, можно использовать его для анализа равновесной энтальпии анфолдинга, и оценить энтальпию Вант Гоффа (которая отражает температурную зависимость константы равновесия анфолдинга) по уравнению $\Delta H^{vH} = 4RT_t^2 [\Delta C_p^{max} / \Delta H_{tot}]$. Совпадение энтальпии Вант Гоффа с величиной калориметрической энтальпии (интегралом теплового эффекта) будет указывать на кооперативный характер перехода между нативным и денатурированным белком без образования промежуточных соединений [18]. Для такого процесса изменение энергии Гиббса будет нулевым при температуре перехода T_t ,

$$\Delta_N^U G(T_t) = \Delta_N^U H(T_t) - T_t \Delta_N^U S(T_t) = 0 \quad (1)$$

и, следовательно,

$$\Delta_N^U S(T_t) = \Delta_N^U H(T_t) / T_t \quad (2)$$

Согласно выражению Кирхгофа, энтальпия и энтропия связаны с разностью величин теплоемкости между нативной и развернутой структурами белка

$$\Delta_N^U C_p(T) = C_p(T)^U - C_p(T)^N \quad (3)$$

выражениями:

$$\frac{\partial \Delta H}{\partial T} = \Delta C_p, \quad \frac{\partial \Delta S}{\partial T} = \Delta C_p / T \quad (4)$$

Температурные зависимости термодинамических величин можно записать как:

$$\Delta_N^U H(T) = \Delta_N^U H(T_t) + \int_{T_t}^T \Delta_N^U C_p(T) dT \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \Delta_N^U S(T) = \Delta_N^U S(T_t) + \int_{T_t}^T \Delta_N^U C_p(T) d \ln T = \Delta_N^U H(T_t) / T_t + \\ + \int_{T_t}^T \Delta_N^U C_p(T) d \ln T \end{aligned} \quad (6)$$

$$\Delta_N^U G(T) = \Delta_N^U H(T) - \Delta_N^U S(T) \quad (7)$$

Таким образом, основная задача определения термодинамических функций сводится к определению теплоемкости нативного и развернутого белка во всем температурном диапазоне.

Возможно альтернативное описание процесса анфолдинга как перехода от исходного нативного белка к полностью развернутому через множество равновесных состояний: $I_0 \leftrightarrow I_1 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow \dots \leftrightarrow I_{n-10} \leftrightarrow I_n$. Разворачивание белковой молекулы также может происходить с образованием смеси из промежуточно денатурированных молекул. Согласно этому подходу, кривые ДСК отражают число конформаций, приобретаемых молекулами образца, а также заселенность всех энергетических уровней [97], что позволяет наблюдать за изменениями заселенности состояний в ходе термической денатурации [90].

Теоретической моделью, описывающей денатурацию через множество промежуточных состояний, стала модель Зимма-Брэгга [98]. В этой модели рассматривается равновесный переход $n \rightleftharpoons u$, где n и u – нативные и развернутые аминокислотные остатки (сегменты белка) соответственно. Равновесие устанавливается за счет формирования кооперативных взаимодействий между аминокислотными остатками в белке. В модели Зимма-Брэгга вводится параметр кооперативности системы σ , который

характеризует размер белкового домена, сворачивающего независимо. Система, в которой величина $\sigma = 1$, демонстрирует крайний случай отсутствия кооперативности. Изучение термического и химического анфолдинга на примере молекул лизоцима позволило установить, что величина параметра кооперативности в процессе термического анфолдинга на 2-3 порядка выше, чем для процесса химического анфолдинга.

По данным ДСК можно обнаружить изменения состояния белка до начала основного калориметрического пика. В частности, изучение формы кривых ДСК белков при различных рН позволило предположить протекание двух качественно отличающихся процессов при нагревании химотрипсиногена, рибонуклеазы и миоглобина [99]. Первый процесс – предденатурационная стадия, характеризуется наклоном на начальном участке калориметрической кривой. На этой стадии наблюдается плавное изменение парциальной теплоемкости системы. Предденатурационное состояние белка характеризуется большей теплоемкостью, что вероятно связано с лабильностью нативной белковой молекулы. Молекула белка разворачивается, однако ее объем и форма сохраняются на протяжении некоторого диапазона температур, соответствующего предденатурационной стадии. Вероятно, изменение парциальной теплоемкости связано с изменением контактов различных групп макромолекул, их доступности растворителю. Второй процесс – непосредственно стадия денатурации, в ходе которой физические параметры системы меняются скачкообразно. На денатурационной стадии уже наблюдается значительное поглощение тепла.

Метод ДСК можно использовать для проверки обратимости денатурации путем проведения повторных сканов нагрева и охлаждения [95], которые должны давать идентичные калориметрические кривые в случае обратимой денатурации. Однако калориметрическая обратимость не всегда служит показателем термодинамической обратимости исследуемого процесса [100].

В системах, демонстрирующих термодинамическую обратимость, может наблюдаться искажение сигнала ДСК кинетическими явлениями (медленные процессы анфолдинга/фолдинга). Под искажением сигнала подразумевается значительное смещение положения пика денатурации при сканировании с разными скоростями. Поскольку конформационные изменения белка занимают конечное время, при изменении внешних параметров соответствующие изменения структуры белка происходят с задержкой. В случае, если эта задержка превышает характеристическое время, за которое меняются внешние параметры, состояние белка становится неравновесным. В случае ДСК характеристическое время изменения температуры задается скоростью сканирования.

Центральное место в исследовании белков занимает равновесный термодинамический анализ, и для его проведения необходимо подбирать подходящие условия. Существуют системы, для которых равновесный анализ неосуществим, например, если процесс денатурации контролируется кинетическими факторами [90]. Возможность изучения равновесного процесса становится ясна по результатам двух проверок – калориметрической обратимости и влияния скорости сканирования. Различные комбинации результатов такой проверки формируют четыре сценария проведения калориметрического анализа белковой системы (Рисунок 6).

Проверка калориметрической обратимости осуществляется путем охлаждения белкового раствора и проведения повторного нагрева после регистрации ДСК кривой анфолдинга. Если на кривой повторного нагрева восстанавливается более 80% исходного теплового эффекта, процесс анфолдинга считают калориметрически обратимым. Важно подобрать температуру завершения первого нагрева для получения наиболее достоверных данных, поскольку при повышенных температурах начинаются необратимые изменения в структуре белков.

Влияние скорости сканирования на отклик системы определяется по величине смещения положения пика денатурации на кривых ДСК при

выполнении нагрева с несколькими скоростями. Влияние скорости сканирования считается существенным в случаях, когда пик смещается на величину большую, чем ширина перехода.

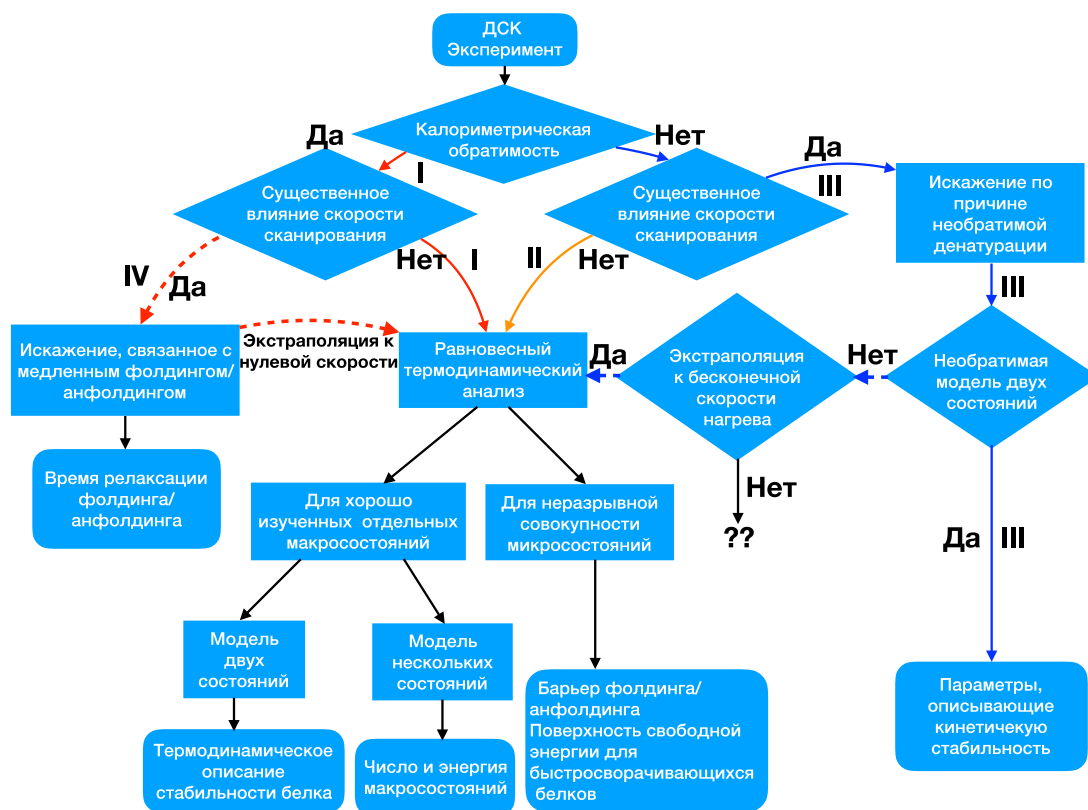


Рисунок 6 – Схема, демонстрирующая несколько вариантов калориметрического анализа, на основе результатов проверки калориметрической обратимости и влияния скорости сканирования на положение калориметрического пика [90].

Для первого сценария (в соответствии с Рисунком 6) характерны калориметрическая обратимость системы и отсутствие значительного влияния скорости сканирования. Систему описывает наиболее простая модель двух состояний ($N \rightleftharpoons D$), удобно проводить равновесный термодинамический анализ, однако, такой сценарий на практике наблюдается очень редко (для маленьких быстро сворачивающихся белков, например, тиоредоксина массой до 12 кДа).

Во втором сценарии отсутствует влияние скорости сканирования, но наблюдается калориметрическая необратимость денатурации. Равновесный термодинамический анализ в этом случае возможен, но лишь до температуры

калориметрического эффекта, поскольку более высокая температура способствует протеканию необратимых процессов (например, агрегации).

Третий сценарий, когда денатурация калориметрически необратима и изменение скорости сканирования влияет на положение калориметрического пика, встречается наиболее часто. Этот сценарий соответствует протеканию денатурации согласно модели Ламри-Эйринга [101], то есть можно предположить образование обратимо развернутых форм белка перед протеканием необратимой стадии. Обработка калориметрических кривых в этом случае позволяет получить наряду с тепловым эффектом процесса денатурации еще и кинетические параметры – значение энергии активации и предэкспоненциального множителя для процесса необратимой денатурации [102].

Другой сценарий, отличный от первых трех, наблюдается в системе, для которой процесс денатурации выглядит калориметрически обратимым, а положение пика значительно отличается при реализации различных скоростей сканирования. Медленное протекание анфолдинга приводит к тому, что система не достигает равновесия в ходе сканирования и на кривой ДСК проявляются кинетические эффекты. Это может быть связано с медленным характером конформационных превращений в молекуле белка при термической денатурации [94]. В этом случае анализ калориметрических кривых также позволяет получать информацию о кинетических параметрах анфолдинга.

Необходимо отметить, что разработка подходов для анализа механизма процессов анфолдинга на основании калориметрических данных продолжается по сей день. В частности, недавно новая методика изучения необратимой денатурации белков с помощью ДСК была представлена в работе Мазуренко [103]. Было продемонстрировано, что на основании сравнения последовательных калориметрических кривых нагрева одного и того же образца можно сделать вывод о том, какая из выше рассмотренных моделей денатурации реализуется.

Качество любых физических измерений, среди прочих факторов, обязательно определяется характеристиками измерительного оборудования и для выполнения калориметрического эксперимента с образцами белка желательно применять специализированные дифференциальные сканирующие калориметры. Схема калориметра, оптимального для работы с растворами белков, была предложена Приваловым [104]. Особенностью прибора является применение несъемных капиллярных ячеек из инертного материала, благодаря которым повышается чувствительность измерения и несколько уменьшается тенденция белков к агрегации. Подобные приборы обладают относительно низкими скоростями сканирования (не выше 2К/мин), что с одной стороны является достоинством, если целью эксперимента является получение равновесных термодинамических параметров процессов анфолдинга/фолдинга, но с другой стороны, длительное время сканирования повышает вероятность побочных процессов, а также ограничивает возможности получения кинетической информации о процессах анфолдинга/фолдинга.

Интерес к применению калориметрических методов анализа биологических систем способствует развитию оборудования. В частности, создание микрокалориметров с малым размером пробы и высокой чувствительностью в настоящее время позволяет исследовать процессы клеточного метаболизма, характеризовать взаимодействия между биомолекулами [105]. Процессы обмена веществ в клетке характеризуются тепловыми эффектами, которые можно зафиксировать калориметрически, используя микрофлюидные ячейки с чувствительностью до 0,2 нВт [106].

Таким образом, калориметрическое исследование процессов анфолдинга и фолдинга имеет большое значение в качестве источника информации о термодинамических, а в некоторых случаях и кинетических параметрах этих процессов. Вместе с тем возможности исследования таких систем определяются характеристиками используемого оборудования. В последнее время наблюдается интенсивное развитие новых вариантов

сканирующей калориметрии, которые находят широкое применение в разных областях химии, но пока мало используются для исследования поведения белковых систем.

1.3. Современные методы калориметрии

1.3.1 Сверхбыстрая сканирующая калориметрия

Классическая дифференциальная сканирующая калориметрия является ценным инструментом для анализа термодинамики белков [90,91], а также медленных процессов денатурации, однако, характеристическое время протекания процессов анфолдинга и рефолдинга требует применения методик быстрого анализа. Временные рамки эксперимента, осуществляемого на традиционном калориметре (обычно десятки минут или часы на сканирование) оказываются очень велики для наблюдения за состоянием белка непосредственно в ходе фолдинга.

Одной из интенсивных областей развития сканирующих калориметров, начиная с середины 1990-х годов, стала сверхбыстрая калориметрия. В настоящее время разработаны неадиабатические сверхбыстрые калориметры, которые обеспечивают измерение тепловых эффектов во время нагрева и охлаждения со скоростью до миллиона градусов в секунду, с точностью определения теплоемкости до $1 \cdot 10^{-9}$ Дж/К [107] и образцами массой порядка десятков нанограмм.

Техническая реализация контролируемого быстрого нагрева, и особенно охлаждения, со скоростями выше 10 К/с, достаточно сложна. Тем не менее, прорыв в этом направлении реализован в начале 2000-х годов, а в 2011 году были выпущены первые коммерчески доступные сверхбыстрые калориметры [108], основной особенностью которых стали сильно уменьшенные размеры измерительной ячейки. Исследования с высокими скоростями сканирования требовали уменьшения размеров объекта исследования и самой калориметрической системы для достижения быстрого отклика и минимизации теплового градиента в образце [109]. Таким образом,

сверхбыстрые калориметры реализованы на основе технологии производства полупроводниковых микросхем (микрочипов).

Первоначальной мотивацией для создания чип-калориметров явилось достижение высокой чувствительности оборудования. Возможность проведения измерения теплоемкости тонких пленок веществ с высоким разрешением (до 10^{-10} Дж/К) при низких температурах впервые была показана в работе [110]. Был создан калориметр, работавший по принципу калориметрии переменного тока, в котором достигалась минимизация собственной теплоемкости измерительной системы путем использования тонкой подложки из стекла и сверхпроводимой пленки $\text{Bi}_{0.4}\text{Sb}_{0.6}$. Однако этот калориметр имел ограниченный рабочий диапазон температур. Рабочий температурный диапазон удалось расширить до 800 К путем использования мембраны из аморфного нитрида кремния в сочетании с тонкопленочными платиновыми резисторами и специализированным термометром для измерения низких температур [111], однако, чувствительность прибора несколько снизилась. Указанные приборы использовались для прецизионного измерения теплоемкостей малоразмерных образцов и имели скорость сканирования на уровне обычных дифференциальных сканирующих калориметров.

На основе ультратонкой мембраны из нитрида кремния в 1995 году был разработан высокочувствительный сканирующий калориметр, позволяющий проводить измерения в квазиadiaбатическом режиме со скоростями до $30\,000^\circ\text{C}/\text{сек}$ [112]. Тонкая пленка никеля (180 нм), нанесенная на слой титана, одновременно служила нагревательным элементом и выполняла функции термометра. Была показана возможность регистрировать изменение температуры в ходе нагрева и фиксировать количество теплоты, передаваемое системе. Дальнейшим развитием квазиadiaбатической тонкопленочной калориметрии стало проведение эксперимента в дифференциальном режиме – измерение величин напряжения и тока одновременно в двух ячейках (образца и сравнения) [113]. Квазиadiaбатический нагрев реализуется в этих

калориметрах за счет помещения измерительной системы в вакуум, низкой теплопроводности полупроводниковой мембраны и короткого времени эксперимента. Техника квазиadiaбатической тонкопленочной калориметрии [114] позволяет наблюдать за изменением величины теплоемкости тонких пленок, состоящих из счетного числа атомарных слоев, т.е. рассматривать теплоемкость как функцию не только температуры, но и толщины слоя образца. Такой анализ был осуществлен в ходе исследования процесса осаждения наночастиц индия на ячейке из нитрида кремния [115]. Было показано, что с уменьшением толщины пленки понижается температура плавления. Более того, анализ влияния толщины пленки на температуру плавления позволил обнаруживать «магическое» число наночастиц в вертикальном слое, способствующее проявлению аномальных свойств [116]. Конечно, в квазиadiaбатических условиях может быть реализован только нагрев образца, в то время как существует ряд задач, для которых необходимо и охлаждение с высокой скоростью.

Принципиальная возможность достижения высоких скоростей охлаждения с использованием чип-калориметров, работающих в неadiaбатическом режиме, впервые показана Адамовским, Минаковым и Шиком [117]. Высокая скорость охлаждения реализуется за счет теплообмена измерительной системы, построенной на основе микрочипа, с окружающим газом. Условиями, определяющими скорость охлаждения, являются разность температур между измерительной ячейкой и газом, собственная теплоемкость и размеры измерительной системы, а также теплопроводность газа.

К настоящему времени описаны различные варианты реализации измерений с использованием чип-калориметров в неadiaбатическом режиме [118,119]. Во всех схемах используются чип-калориметры, изготовленные по технологии MEMS (microelectromechanical systems) [120]. Коммерчески доступный калориметр Flash DSC1 позволяет работать в диапазоне температур от -95 до 450°C с использованием холодильника. Скорости сканирования составляют 1 – 4 000 K/c на охлаждении и 1 – 40 000 K/c на

нагреве, в то время как масса образца уменьшается до 10^{-9} – 10^{-6} гр., а чувствительность прибора достигает 1 нДж/К [107].

В методе сверхбыстрой калориметрии калориметр представляет собой микрочип с двумя ячейками (для образца и эталона) (Рисунок 7 справа). Для чип-сенсора UFS1, приспособленного к сверхбыстрым калориметрам Mettler Toledo FlashDSC1 и FlashDSC2+, диаметр измерительной ячейки составляет 0,5 мм. В качестве материала мембраны выступает нитрид кремния, поверхность которого покрыта оксидом кремния. Свойства этих материалов позволяют изготавливать мембраны толщиной от 2 микрон и ниже, за счет чего их собственная теплоемкость оказывается очень мала и, таким образом, становится возможным сканирование с высокими скоростями [108]. Нагревательные и измерительные элементы (резисторы и термопары) могут быть созданы путем напыления металлов на мембрану или за счет создания допированных регионов в самом материале мембраны.



Рисунок 7 – Сверхбыстрый калориметр FSC1. Вид на калориметр и встроенный микроскоп (слева), держатель чип-сенсора (справа).

Одной из предпосылок к созданию метода сверхбыстрой калориметрии, в котором реализуются и быстрый нагрев, и быстрое охлаждение, стал фундаментальный интерес к анализу процессов кристаллизации и плавления

полимеров. Полимерные системы, в которых присутствуют наноразмерные кристаллиты, могут претерпевать процессы реорганизации, включающие холодную кристаллизацию и перекристаллизацию, отследить которые не представляется возможным по кривым ДСК. Для изучения процессов реорганизации необходимо применение больших скоростей сканирования, сравнимых со скоростями процессов реорганизации [117]. Метод сверхбыстрой калориметрии нашел применение в исследовании кинетики зародышеобразования и кристаллизации полимеров по схеме Таммана (Рисунок 8) в широком температурном диапазоне. На первой стадии в ходе такого исследования происходит плавление, в результате которого обеспечивается максимальный термический контакт образца и поверхности сенсора. Далее расплавленный образец охлаждается до температуры отжига со скоростью 5 000 К/с, и осуществляется процедура отжига (изотермический сегмент) расплава в течение различных промежутков времени. После стадии отжига регистрируется кривая нагрева (от -80°C) для анализа тепловых эффектов стеклования, холодной кристаллизации и плавления. Метод сверхбыстрой калориметрии позволяет подбирать и реализовывать скорости нагрева и охлаждения таким образом, чтобы зародыши кристаллов не успевали формироваться на вспомогательных сканах, а процессы нуклеации и кристаллизации протекали лишь на стадии отжига. Высокие скорости сканирования, доступные современной калориметрии, и возможность реализации изотермических сегментов длительностью менее 0,1 с позволяют контролировать размеры получаемых кристаллов [121], определять критические скорости охлаждения и подавлять процессы кристаллизации и зародышеобразования [122].

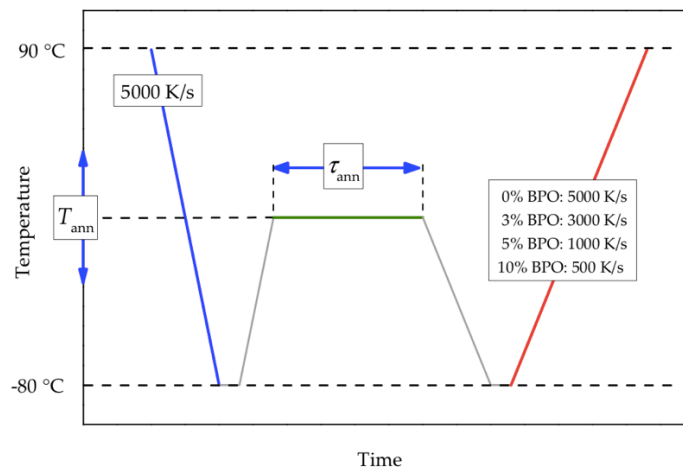


Рисунок 8 – Температурная программа для исследования кинетики кристаллизации и зародышеобразования (нуклеации) сшитого поли(ϵ -капролактона). Расплавленный образец быстро охлаждается до температуры изотермического выдерживания (которая варьируется наряду с длительностью), после стадии изотермического выдерживания регистрируется измерительный скан для определения энтальпии плавления [123].

Исследование свойств веществ с высокими скоростями сканирования имеет практическое значение, поскольку быстрое охлаждение (от 100 до 10 000 К/с) наблюдается, к примеру, в процессах выдувного формования и литья под давлением, используемых при создании полимерных изделий, а в технологиях селективного лазерного плавления/спекания происходят и нагрев, и охлаждение с высокими скоростями. При этом сверхбыстрая калориметрия является практически единственным методом исследования, который позволяет осуществлять охлаждение в управляемом режиме с сопоставимыми и даже большими скоростями.

Возможность получения аморфного состояния веществ за счет высокой скорости охлаждения представляет интерес в области фармацевтики. В отличие от кристаллической формы лекарственных препаратов аморфная форма характеризуется повышенной растворимостью и высокой биодоступностью, что снижает требуемую дозу препарата и уменьшает его токсичное воздействие [124,125].

Еще одна область применения сверхбыстрой калориметрии – исследование термически неустойчивых соединений. Реализация скоростей

нагрева и охлаждения до 10^6 K/c [126] позволяет изучать теплофизические свойства веществ, нестабильных при высоких температурах, таких как, ионные жидкости [127], метастабильные полиморфные формы [128]. Метод сверхбыстрой калориметрии был успешно использован для определения температур и энтальпий плавления термически нестойких органических соединений [129], показана возможность измерения теплоемкости таких молекул в жидком состоянии [130].

Быстрая сканирующая калориметрия продемонстрировала исключительную значимость при определении температурной зависимости энтальпии [131]. При сравнении различных веществ важно использовать тепловые эффекты плавления, приведенные к одной стандартной температуре (например, 298,15 K), для чего можно использовать данные по энтальпии плавления при температуре плавления, а также значения теплоемкостей жидкой и кристаллической форм исследуемого вещества. Однако теплоемкость жидкой фазы бывает трудно измерить, если стандартная температура оказывается ниже температуры плавления, а вещество легко кристаллизуется. Высокие скорости нагрева/охлаждения позволяют получать переохлажденное жидкое состояние многих соединений и измерять теплоемкость вещества в таком состоянии. Методику сверхбыстрого нагрева/охлаждения применяют для определения давления пара, энтальпии сублимации и испарения малолетучих соединений, таких как азотистые основания, разлагающиеся в условиях медленного нагрева [132].

С развитием сверхбыстрой калориметрии новые возможности открываются в области исследования белков [107]. Использование сверхбыстрых калориметров позволяет значительно сокращать время анализа биологических материалов, а также уменьшать размеры проб. Масса образца подбирается в зависимости от используемых скоростей сканирования, составляет менее 0,1 мг [133].

Первым применением сверхбыстрых калориметров для исследования свойств белков явилась работа, в которой было изучено плавление

фибрилярного белка фиброина шелка [134]. Фиброин шелка может быть переведен в кристаллическое состояние; в работе впервые удалось показать обратимое плавление в ходе нагрева кристаллов белка. Прежде удавалось наблюдать лишь термическую деструкцию белка задолго до начала плавления. Для проведения анализа на сенсор наносилась небольшая капля силиконового масла, поверх которой размещался образец – тонкая пленка фиброина шелка. Температурная программа состояла из нагрева и охлаждения со скоростями 2 000 К/с и короткой изотермой между сканами в течение 0,01 с. По измеренным величинам теплового потока удалось рассчитать теплоемкость расплавленного белка [135], получить которую традиционные калориметры не позволяют.

Ожидается, что исследование фибриллярных белков с высокими скоростями сканирования позволит глубже понять свойства и различие процессов плавления синтетических полимеров и фибриллярных белков. Определение характеристик плавления пленок фиброина шелка, изготовленных в разных условиях и с различной степенью кристалличности, будет способствовать разработке шелковых материалов с необходимыми характеристиками [136].

Также в литературе приводится несколько исследований глобулярных белков в растворе методом сверхбыстрой калориметрии. Исследование водных растворов белков методом сверхбыстрой калориметрии требует модификации калориметрического сенсора, поскольку малый объем образца приводит к слишком быстрому испарению воды при использовании стандартных (открытых) чип-сенсоров. Сплинтер и др. [137,138] разработали и впервые применили жидкостной чип-калориметр с пластиковой накладкой (Рисунок 9), позволяющий анализировать жидкие образцы со скоростями сканирования до 1 000 К/с). Объем ячейки такого чип сенсора составляет примерно 1 мкл, в то время как непосредственно над нагревателем находится 0,01 мкл жидкости.

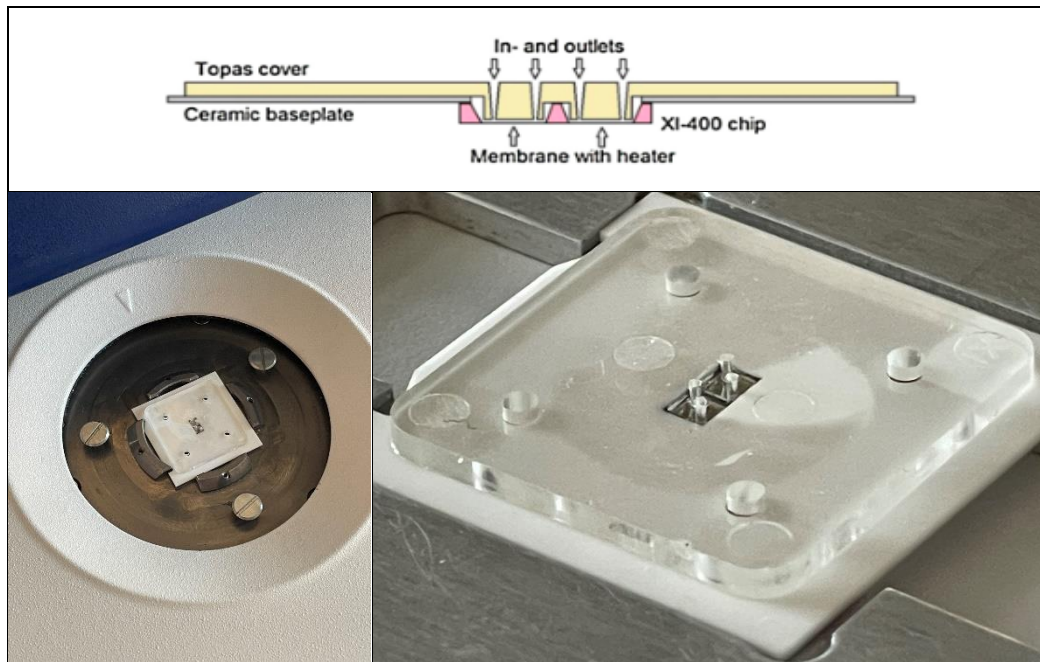


Рисунок 9 – Верхняя картинка - жидкостной чип-калориметр в разрезе [137]. Отверстия для введения и вывода жидкого образца могут иметь разный объем от сенсора к сенсору. Величина зазора определяется в процессе изготовления чипа. Нижняя картинка слева – жидкостной чип, помещенный в прибор, справа – приближенное изображение.

Измерения кривых денатурации лизоцима и альбумина в водных растворах на жидкостном чип-калориметре показали высокую воспроизводимость результатов, полученных на жидкостных сенсорах, а также возможность анализа водного раствора лизоцима с концентрацией от 1% до 10% по массе. Реализация скоростей сканирования от 100 до 400 градусов в секунду позволили продемонстрировать наличие двух отчетливых пиков на кривых денатурации бычьего сывороточного альбумина.

Жидкостная сверхбыстрая калориметрия может быть применена для анализа биологических проб, например, сыворотки крови человека. У пациентов с диагнозом рака почек наблюдается пониженное содержание иммуноглобулина (IgG) в сыворотке крови. Такое отклонение от нормального содержания можно обнаружить, сравнивая кривые ДСК пациентов с результатами, полученными для здорового организма [138]. Вместе с тем, надо отметить, что жидкостные чип-сенсоры имеют значительные ограничения по максимальной скорости нагрева и охлаждения (не выше 500 К/с), в то время

как на сенсорах типа UFS1 реализуются скорости нагрева до 40 000 К/с, а охлаждения до 4 000 К/с.

Кинетика анфолдинга лизоцима в глицерине [139] была изучена при нагреве со скоростями до 8 000 К/с. Подобные скорости удается реализовать с использованием открытых калориметрических чип-сенсоров. Проблема испарения растворителя была решена путем использования глицерина. Ранее было показано, что лизоцим сворачивается в водно-глицериновых смесях [140] и в практически чистом глицерине [141,142], хотя позже были описаны некоторые различия конформаций лизоцима в водной и глицериновой средах [143].

Таким образом, неадиабатическая сверхбыстрая чип-калориметрия является интенсивно развивающимся методом, зарекомендовавшим себя в качестве источника уникальной информации, недоступной традиционным калориметрическим методикам. Представляет интерес дальнейшее развитие методик на основе сверхбыстрой калориметрии в области изучения анфолдинга и фолдинга белков.

1.3.2 Термомодулированная калориметрия

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) занимает особое место среди других методов наблюдения за денатурацией белков, однако, исследование взаимосвязи между кинетическими и термодинамическими свойствами системы в рамках классической ДСК затруднено. Подобную возможность предоставляет развитие метода ДСК – калориметрия с температурной модуляцией (ТМДСК). Методы ТМДСК позволяют оценивать так называемые обратимую и необратимую составляющие регистрируемого на калориметрической кривой теплового эффекта. Первая (обратимая) составляющая характеризует процессы, способные релаксировать гораздо быстрее периода модуляции, а вторая (необратимая составляющая) – указывает на протекание процессов с более длительным временем релаксации, не успевающих завершиться за период модуляции.

Скорость нагрева в методе ТМДСК не является постоянной, а изменяется со временем, и ее можно представить в виде комбинации некоторой периодической функции (например, косинусоидальной) с постоянным базовым вкладом, т.е.,

$$\beta = \beta_0 + a \cdot \text{Cos}(\omega t) \quad (8)$$

где β_0 – базовая постоянная скорость сканирования, ω – частота модуляции, a – амплитуда модуляции.

Также был предложен метод ДСК со ступенчатым сканированием [144], первоначально применявшийся для определения чистоты веществ на основе закона Вант-Гоффа. В этом методе скорость сканирования описывается ангармонической лестничной или пилообразной функцией. В простейшем случае температурный профиль включает короткий шаг нагрева (или охлаждения), за которым следует изотерма. Повторение таких шагов постоянно выводит систему из состояния равновесия, а затем позволяет ей релаксировать в направлении нового равновесия, и, если изотерма достаточно длинная, в системе устанавливается новое равновесное состояние.

Поскольку ступенчатый сигнал содержит вклады сразу от многих гармоник основной частоты модуляции, метод ступенчатого сканирования может быть применен для получения спектра теплоемкости [145,146], причем метод был распространен на низкие и высокие частоты модуляции [147]. Недавно этот метод был использован при исследовании стеклования полимеров [148], а также нашел применение в области изучения кристаллизации полимеров [149,150] и при термическом анализе лекарственных препаратов [151]. Было показано [149], что метод термомодуляционной калориметрии позволяет различить процессы плавления и рекристаллизации, которые приводят к появлению сложной картины из нескольких перекрывающихся пиков на кривых классической ДСК. Комбинация результатов, полученных при высоких (за счет использования сверхбыстрого калориметра) и низких (при использовании обычного ДСК) частотах модуляции показывает, что при медленном нагреве происходит

перестройка кристаллов полимера без плавления, а в случае высоких скоростей нагрева происходит рекристаллизация, т.е. плавление мелких кристаллов с образованием крупных.

Метод ТМДСК получил лишь ограниченное применение в области исследования белков, несмотря на то, что показана возможность улучшения разрешения регистрируемых тепловых эффектов при использовании режима температурной модуляции, по сравнению с обычным нагревом (с постоянной скоростью) [152]. Исследование белка сои в режиме температурной модуляции позволило выделить вклад необратимого процесса агрегации в суммарный тепловой эффект, а также провести оценку влагоудерживающих свойств белка [42].

В работах [153,154] методом ТМДСК с синусоидальной модуляцией была исследована денатурация лизоцима в воде при pH 2.5 в температурном диапазоне от 20 до 95°C. Как и в работе [42] было показано, что с помощью этой методики можно разделять обратимую и необратимую составляющие теплового эффекта. На основании полученных данных, авторы работы [153] предполагают полное соответствие механизма денатурации лизоцима модели Ламри-Эйринга.

Особый интерес при исследовании белков представляет реализация ступенчатой модуляции. Авторы работы [155] описали устройство высокочувствительного квазиadiaбатического дифференциального калориметра, который может реализовывать ступенчатую температурную программу при средней скорости сканирования 0,25 и 0,5 К/мин. В качестве объекта исследования был использован белок ингибитор трипсина сои Куница, который демонстрирует обратимую денатурацию, однако скорости как процесса денатурации, так и ренатурации у этого белка крайне малы, поэтому для не слишком малых скоростей нагрева процесс денатурации белка можно рассматривать необратимым. Авторами показано, что термомодуляционная калориметрия позволяет получить температурную зависимость константы скорости, а также энергию активации процесса

необратимой денатурации в одном эксперименте. Для этого авторы предложили метод обработки результатов, заключающийся в интегрировании тепловых потоков, зарегистрированных в единичном сегменте. Зависимости константы скорости от температуры могут быть рассчитаны по отношению средних тепловых мощностей на данном изотермическом сегменте и всех предыдущих сегментах.

В работе [156] приведен пример анализа кривых ступенчатого нагрева для обратимой и необратимой денатурации. Авторы описывают сигнал ДСК в режиме ступенчатого сканирования по уравнению:

$$\text{Тепловой поток} = C_p \left(\frac{dT}{dt} \right) + f(T, t)$$

Здесь C_p – теплоемкость образца, $\left(\frac{dT}{dt} \right)$ – скорость нагрева, $f(T, t)$ – кинетический вклад в ходе нагрева. В случае полностью обратимой денатурации, величину теплового потока определяет первое слагаемое, а вклад второго – мал, в случае необратимой денатурации наблюдается обратная картина.

Потенциально метод термомодулированной калориметрии позволяет извлекать как термодинамическую, так и кинетическую информацию из одного и того же эксперимента и, таким образом, дает возможность отличать качественно различающиеся механизмы денатурации белков.

1.4 Лизоцим – модельный белок

Для создания новых методик разумным является использование хорошо изученного, доступного и стабильного объекта исследования, в области анализа процессов анфолдинга и фолдинга таким объектом является лизоцим куриного белка.

Лизоцим является одним из наиболее изученных модельных белков; высокая стабильность и сравнительно простое выделение которого в чистом виде способствовали ранним исследованиям его структуры и свойств [157]. Он представляет собой небольшой мономерный белок, стабилизированный

дисульфидными связями, в то же время в некоторых условиях может ассоциироваться в димеры [158].

Александр Флеминг открыл лизоцим в 1922 году в ходе исследования численности колоний стафилококка в слизистых выделениях пациентов с острым ринитом. Оказалось, что фермент способствует лизису бактериальных клеток [159]. Присутствие лизоцима обнаружено в составе носовой слизи, молока, слезной жидкости и некоторых тканей; при этом свойства белка, выделенного из разных источников, как было выявлено, отличаются, то есть существует целое семейство лизоцимов [160]. Вместе с тем, в качестве модельного белка в различных исследованиях чаще всего используется лизоцим куриного белка (или c-type lysozyme, chicken egg white lysozyme), он является классическим представителем семейства лизоцимов.

Функцией лизоцима в организме является разрушение молекул полисахаридов, входящих в состав клеточной стенки некоторых бактерий. Бактерицидная активность такого типа реализуется за счет расщепления связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой.

В экспериментальных исследованиях наличие нативной структуры у лизоцима нередко подтверждается биологической активностью, измеряемой по данным УФ-спектроскопии. Если молекула белка активна, то в суспензии, содержащей колонии бактерий *Micrococcus lysodeikticus*, происходит лизис клеток, что отражается на величине поглощения света при длине волны 450 нм, а скорость, с которой уменьшается поглощение, пропорциональна активности лизоцима [161].

Лизоцим стал первым белком, в аминокислотной последовательности которого в 1966 году методом рентгеноструктурного анализа было обнаружено наличие всех 20 незаменимых аминокислот [162]. Полипептидная цепь лизоцима, сформированная из 129 аминокислотных остатков, сшивается поперечно 4 дисульфидными мостиками (S-S) [163]. Приблизительные размеры молекулы $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ ($10 \text{ \AA} = 1 \text{ нм}$) [164], молекулярная масса 14,307 кДа [165], изоэлектрическая точка при pH 11,35, заряд молекулы

лизозима оказывается положительным при нейтральном pH [166]. Третичная структура лизоцима представлена двумя доменами, один домен состоит из четырех α -спиралей, второй представляет собой трехслойный β -лист (Рисунок 10). Еще один двухслойный β -лист связывает два домена между собой [167].

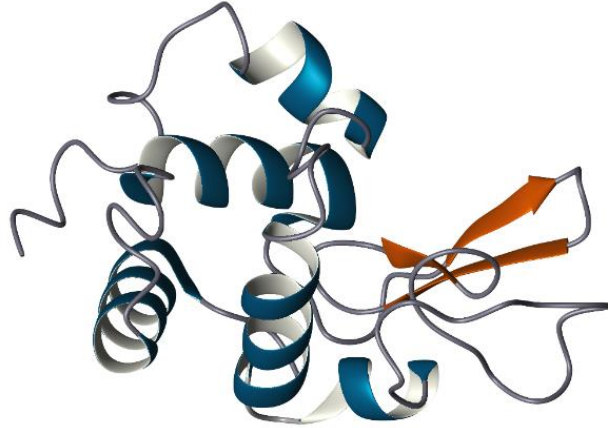


Рисунок 10 – Схематическое изображение трехмерной структуры лизоцима, установленной методом рентгеновской кристаллографии в 1966 г. (PDB – protein data bank) [168].

Лизоцим широко используется в исследованиях влияния различных факторов (например, pH среды, денатурирующие добавки, термическая обработка) на стабильность белка, а результаты, полученные для него, нередко распространяют на глобулярные белки в целом [169].

В частности, установлено, что температура и энтальпия денатурации лизоцима зависят от степени гидратации молекул белка. Методом ДСК показано, что при малых содержаниях воды температура денатурации повышается, а тепловой эффект денатурации, наоборот, понижается. При содержании воды ниже 0,3 г (~ 240 моль воды на 1 моль белка) на 1 г белка пространственная структура лизоцима демонстрирует наибольшую стабильность [170].

Понижение pH среды понижает температуру денатурации лизоцима, что подтверждается методом дисперсии оптического вращения при различной температуре для белка в растворе хлорида гуанидиния [171]. Добавление

спиртов [172], мочевины, хлорида гуанидиния [173], катионов кальция, магния и др. [174], также понижает термическую стабильность лизоцима.

Существуют добавки, повышающие стойкость лизоцима к термической денатурации, например, полиэтиленгликоль [175], различные сахара [176], ионные жидкости. В нескольких работах рассматривалось влияние диметилсульфоксида (ДМСО) на термическую стабильность лизоцима [177–179]. Небольшая добавка этого растворителя повышает устойчивость нативной структуры лизоцима, однако, при концентрациях выше 30 мольных % добавление ДМСО уже снижает термостабильность белка, способствуя разворачиванию гидрофобных остатков и может приводить к агрегации при высоких концентрациях белка [178].

Установлено, что лизоцим правильно сворачивается не только в воде, но и в 99%-ом глицерине [141,142], хотя в структуре белка наблюдаются некоторые различия [143]. Процесс сворачивания в растворах, содержащих глицерин, замедлен относительно скорости фолдинга в водном растворе, что связывают с формированием избыточного количества гидрофобных взаимодействий [140].

Для описания свойств и параметров белковой системы следует выбрать подходящую модель денатурации, при этом, возникает вопрос – переход от нативной формы белка к денатурированной подчиняется модели двух состояний или более сложной модели [180]. При этом наблюдаемый механизм денатурации для одного и того же белка может различаться в зависимости от условий, к примеру, исследование рефолдинга лизоцима при различных рН методом спектроскопии кругового дихроизма в дальней УФ-области привело авторов к выводу о том, что кислотность среды меняет механизм сворачивания белка [181].

Наблюдение за процессом рефолдинга лизоцима в водном растворе в присутствии гуанидиний хлорида и сульфата натрия (выступающего в качестве стабилизатора нативной структуры) методом быстрого смешения на спектрометре КД позволили предложить «треугольный» механизм фолдинга с

двумя равновесными путями – помимо прямого равновесия между нативной и денатурированной формами лизоцима, существует путь через образование интермедиата [182].

Отмечается, что денатурированный лизоцим может представлять собой совокупность молекул с различной степенью компактности [173], а использование специальных методик позволяет зарегистрировать образование частично свернутых форм (интермедиатов) в ходе анфолдинга [183]. В обзорной работе [167] обсуждаются результаты исследования кинетики сворачивания лизоцима методами ЯМР спектроскопии, электроспрейной ионизационной масс-спектрометрии, флуоресцентной, УФ спектроскопии и спектроскопии КД, с помощью которых удавалось обнаружить формирование устойчивых интермедиатов при переходе от нативной формы лизоцима к денатурированной. Предполагается, что процесс разворачивания полипептидной цепи – сложный, и механизм его отличается от модели двух состояний.

Появляются предположения о факторах, определяющих путь денатурации лизоцима, в частности, результаты применения математического подхода (хеометрии) к процессу осаждения белка в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и β -циклодекстрина [184] привели к выводу о том, что при низком pH в растворе лизоцима может протекать нейтрализация аминокислотных остатков – лизина, аргинина, гистидина, что ведет к увеличению гидрофобности белка и его постепенной агрегации (необратимой денатурации).

Лизоцим стал одним из первых белков, для которого переход между нативным и денатурированным состояниями был охарактеризован калориметрически [185]. Кривые термической денатурации лизоцима, измеренные методом ДСК [95], приведены на Рисунке 11.

Высокая термостабильность, обратимый характер отклика на термическое воздействие и четко выраженный тепловой эффект денатурации на кривой ДСК способствовали частому выбору лизоцима в качестве объекта

калориметрических исследований [186]. Применение различных калориметрических методов – микрокалориметрии [96,174,181,187–193], изотермической титрационной [28,98,185], модуляционной [34,153,154,156,194], сверхбыстрой [137,139] калориметрии способствовало более подробному изучению процессов анфолдинга и фолдинга, влияния добавок и других факторов на стабильность лизоцима. В отличие от результатов спектроскопического анализа, калориметрические данные, как правило, свидетельствуют о денатурации лизоцима в соответствии с моделью двух состояний.

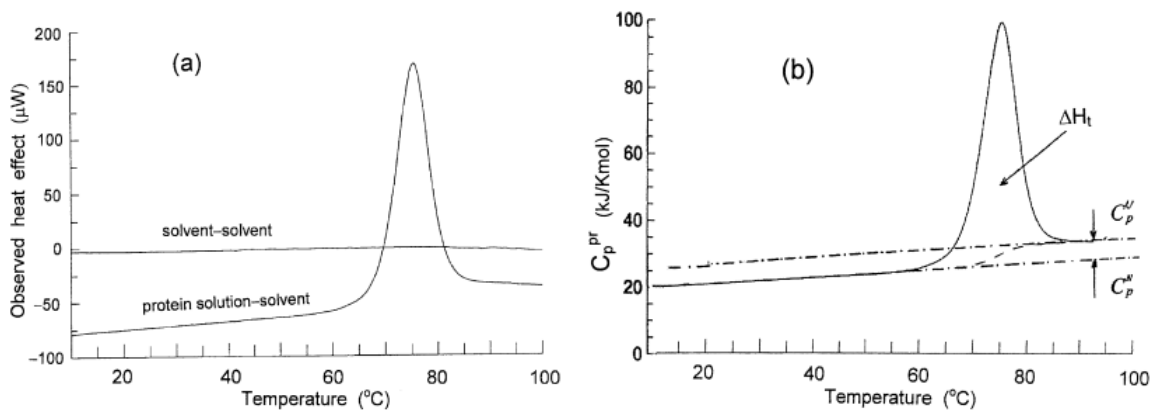


Рисунок 11 – Кривые теплового потока: (а) калориметрическая кривая нагрева раствора лизоцима с концентрацией белка 2 мг/мл (в 20 мМ ацетата натрия, рН 4.0, 100 мМ NaCl) и кривая холостого эксперимента, полученная при заполнении обеих ячеек калориметра растворителем; (б) изменение кажущейся удельной теплоемкости лизоцима, рассчитанное из эксперимента (а), представляет собой разность теплоемкостей белкового раствора и растворителя [95].

Измеренные значения калориметрической энтальпии и температуры анфолдинга лизоцима куриного белка зависят от условий эксперимента: в чистой воде получены величина энтальпии 494 ± 10 (кДж/моль) и температура анфолдинга 78°C [189], в других работах $\Delta_d H_{cal}$ и T_d составили $464,4$ кДж/моль и $\sim 72,3 \pm 0,07$ ($^{\circ}\text{C}$) соответственно [187], 454 ± 3 (кДж/моль) и $\sim 74,2^{\circ}\text{C}$ (для лиофилизированного лизоцима при рН 8.0) [96], 476 ± 28 (кДж/моль) и $66,4 \pm 0,5$ ($^{\circ}\text{C}$) (для лиофилизированного лизоцима при рН 2.5) [142],

$536,7 \pm 2,8$ (кДж/моль) и $77,19 \pm 0,01$ ($^{\circ}\text{C}$) (для лизоцима после 6 процедур перекристаллизации) [195], в 0,01 М фосфатном буфере $409,3 \pm 8,6$ (кДж/моль) и $73,76 \pm 0,01$ ($^{\circ}\text{C}$) (рН 6.89) [196], в 0,02 М фосфатном буфере $426,3$ кДж/моль и $69,6^{\circ}\text{C}$ (рН 3.0) [190], в 0,02 М глициновом буфере 481 кДж/моль и $64,1^{\circ}\text{C}$ (рН 2.5) [104]. Большой разброс измеренных значений демонстрирует необходимость получения собственных надежных данных в контролируемых условиях для решения задач разработки новых калориметрических методик исследования белков.

С развитием метода сверхбыстрой калориметрии, использующей чип-калориметры, удалось расширить реализуемые скорости сканирования лизоцима в воде до 400 К/с [137], а в растворе глицерина до $8\ 000$ К/с [139], что позволило оценить энтальпию и энергию активации процесса разворачивания лизоцима в глицерине. Результаты, полученные в работе [139] свидетельствовали о сложном механизме анфолдинга лизоцима в глицерине.

Как было показано выше, лизоцим использовался в качестве модельного белка в работах, посвященных методу термомодулированной калориметрии [153,154,156]. В частности, была продемонстрирована обратимость термического анфолдинга лизоцима и показано наличие равновесия для промежуточных состояний белка [153].

Для процесса денатурации лизоцима в протонированной и дейтерированной воде [154] получены значения температуры перехода, калориметрической энтальпии и разности теплоемкостей двух форм по методу ТМДСК, установлен температурный диапазон протекания предденатурационной стадии для лизоцима – от 47 до 67°C . Реализация температурной модуляции на устройстве MEMS для лизоцима в глициновом буфере (0,1 М, рН 2.5) [194] позволила рассчитать разность удельных теплоемкостей нативной и развернутой форм (3 кДж/моль \cdot К), величину энтальпии анфолдинга $350 - 380$ кДж/моль, однако, была отмечена необходимость создания более чувствительных устройств с ускоренной

обработкой электрического сигнала для повышения точности измеряемых величин.

Важным условием для проведения термодинамического анализа является обратимость процессов в системе [95]. Исследование обратимости термической денатурации лизоцима [190] путем сравнения калориметрических кривых повторного нагрева (Рисунок 12), позволило заметить значительное снижение обратимости анфолдинга лизоцима при нагреве выше 75°C. Кривые повторного нагрева лизоцима помимо основного пика, содержат эффекты в предденатурационной области – до регистрации основного пика анфолдинга, вероятно, связанные с протеканием необратимой денатурации.

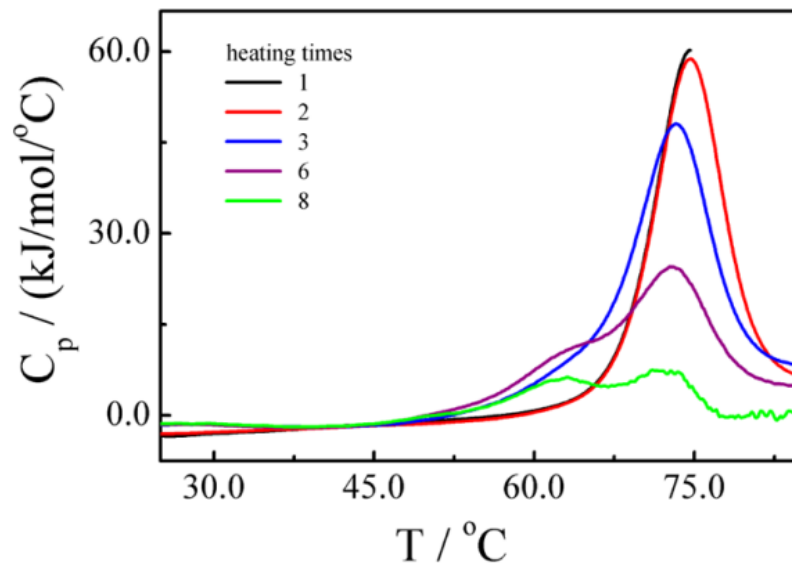


Рисунок 12 – Зависимость молярной избыточной теплоемкости лизоцима от температуры после вычитания базовой линии при регистрации последовательных сканов нагрева; скорость сканирования 1 К/мин, концентрация лизоцима 3 мг/мл, рН 3.0 [190].

В работах [190,191,197] развитие дополнительного калориметрического пика связывают с протеканием необратимой денатурации (агрегации) лизоцима. Другой причиной формирования двойного пика на кривых охлаждения и повторного нагрева может быть сложный механизм анфолдинга, отличный от простой одностадийной модели. Авторы работы [198] предположили существование разных путей сворачивания двух доменов

лизоцима (α и β), и в рамках такого предположения были оценены температуры переходов – для основной $\sim 76,1^\circ\text{C}$ и дополнительной $\sim 66^\circ\text{C}$ форм лизоцима.

Лизоцим является одним из наиболее часто используемых модельных белков для исследований калориметрическими методами, поэтому он является оптимальным объектом для развития новых калориметрических методик с целью исследования процессов анфолдинга и фолдинга белков. Нужно отметить, что в калориметрических исследованиях лизоцим часто упоминается как пример обратимой денатурации по модели двух состояний, хотя экспериментально установлено наличие интермедиатов как в ходе фолдинга, так и в ходе анфолдинга. Поэтому представляет особый интерес развитие калориметрических методик, которые позволяют получать не только термодинамическую, но и кинетическую информацию об этих процессах. Вместе с тем, для лучшего понимания процессов анфолдинга и рефолдинга лизоцима вначале нужно детально изучить причину и характеристики необратимых процессов деградации белка, отмеченных в приведенных выше работах.

Выводы по Главе 1

В настоящее время для экспериментального исследования фолдинга белков используют в основном методы быстрого перемешивания в комбинации со спектроскопическими методиками, в то время как традиционная сканирующая калориметрия не позволяет изучить быстрые процессы фолдинга. В последнее время стал широко применяться метод сверхбыстрой калориметрии. Возможности метода позволяют наблюдать за быстрыми процессами, такими как кристаллизация полимеров. Однако метод сверхбыстрой калориметрии не слишком часто применялся к белкам, и в настоящей работе мы показываем его возможности для исследования кинетики рефолдинга.

Несмотря на большой объем литературных данных по исследованиям белков, появляется необходимость в развитии новых методик анализа для

более подробного изучения механизмов денатурации и фолдинга белков. С этой позиции интересен метод термомодулированной калориметрии, позволяющий разделять вклады кинетически обратимых и необратимых процессов в регистрируемый тепловой поток на кривых ДСК. Метод ТМДСК со ступенчатым сканированием показывает важное преимущество по сравнению с классической калориметрией, позволяя учитывать тепловые потери в ходе эксперимента.

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным развитие новых калориметрических подходов для исследования анфолдинга и фолдинга белков на основе сверхбыстрой и термомодулированной калориметрии.

Оптимальным модельным объектом для такой работы представляется лизоцим, как белок, во-первых, достаточно стабильный и доступный, а во-вторых, подробно исследованный, что позволяет опираться на литературные материалы при анализе результатов работы.

Вместе с тем, появление дополнительного низкотемпературного пика на кривых повторного нагрева лизоцима, может сказываться на результатах измерений. Причины этого эффекта необходимо установить перед разработкой экспериментальных методик.

Таким образом, анализ литературных данных позволил сформулировать в качестве цели настоящей работы разработку новых калориметрических подходов для изучения процессов анфолдинга и фолдинга белка.

Для достижения этой цели необходимо решить следующие задачи:

- анализ необратимой денатурации модельного белка лизоцима методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния;

- изучение кинетики и механизма анфолдинга и фолдинга лизоцима методом сверхбыстрой калориметрии:

 - изучение изотермического фолдинга лизоцима в глицерине;

 - изучение анфолдинга лизоцима методом ступенчатого нагрева;

- математическое моделирование процесса анфолдинга белка в режиме ступенчатого нагрева для установления связи между кинетикой анфолдинга и формой калориметрических кривых в режиме ступенчатого нагрева;

- определение критериев применения сверхбыстрой калориметрии в области исследования процессов анфолдинга и фолдинга белков.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Материалы

Лизоцим белка куриного яйца (Sigma Aldrich 62970, Сент-Луис, МО, США) использовали без дополнительной очистки. Диметилсульфоксид (Компонент-Реактив, Москва, Россия, 99%) очищали в соответствии с рекомендациями в литературе [199]. Для измерений ИК-Фурье использовали тяжелую воду ("Прикладная химия", Санкт-Петербург, Россия, содержание дейтерия $\geq 99,9\%$). В других случаях использовалась деионизованная вода (18,2 МОм·см). Буферные соли не добавлялись. Белковые растворы готовили путем растворения взвешенного сухого белка в необходимом количестве растворителя. Концентрацию белка в водных растворах подтверждали спектрофотометрически по поглощению при 280 нм (коэффициент экстинкции лизоцима составляет $2,65 \text{ мл}\cdot\text{мг}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [200]).

Для измерений на сверхбыстром калориметре использовали глицерин (G7893, Sigma-Aldrich, $> 99,5\%$) без дополнительной очистки. Готовили раствор, содержащий 50 мг/мл лизоцима. Раствор лизоцима готовили по схеме описанной в работе [139], растворяя лиофилизированный белок в соответствующем количестве чистого глицерина. Для облегчения растворения глицерин нагревали до 50°C и смесь обрабатывали ультразвуком до получения прозрачного раствора. Лиофилизированный белок содержит около 10% воды по весу, поэтому полученный раствор может содержать около 0,5% воды по весу. Эта остаточная вода удалялась путем выполнения серии нагревов и охлаждений образца перед основным сканированием.

2.2 Методы

2.2.1 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Кривые ДСК лизоцима в воде и смесях ДМСО-вода получены на капиллярном калориметре NanoDSC, оснащенном автосемплером (TA Instruments, Нью-Касл, Делавэр, США). Объем ячеек 0,3 мл. Калибровку температуры проверяли по пику денатурации лизоцима в 0,1 М глициновом буфере при pH 2,4 в соответствии с рекомендациями производителя. Тепловой поток калибровали по теплоемкости тяжелой воды, как описано в работе [201]. Скорость нагрева и охлаждения во всех экспериментах с непрерывным нагревом составляла 1 К·мин⁻¹. Давление в приборе, в соответствии со спецификацией производителя, составляло $0,30 \pm 0,005$ (МПа) (продувочный газ – азот).

2.2.2 Сверхбыстрая калориметрия

Эксперименты по сверхбыстрой калориметрии проводили на калориметрах Mettler Toledo Flash DSC1, Flash DSC2+ (Mettler-Toledo, Грайфензее, Швейцария) с калориметрическим датчиком UFS1 [108,202]. Температурную калибровку датчика осуществляли, измеряя точки начала плавления калибровочных стандартов бифенила и бензойной кислоты.

Для измерения тепловых эффектов анфолдинга белка каплю раствора лизоцима в глицерине помещали на центр датчика UFS1 (Рисунок 13) с помощью петли из медной проволоки диаметром 20 мкм. Размер капли подбирался для минимизации теплового запаздывания и поддержания хорошего соотношения сигнал/шум. Таким образом, при работе на относительно медленных скоростях сканирования (~ 100 К/с) использовали капли большого размера, для измерений с большими скоростями сканирования (~ 1 000 К/с) применяли капли меньшего размера.

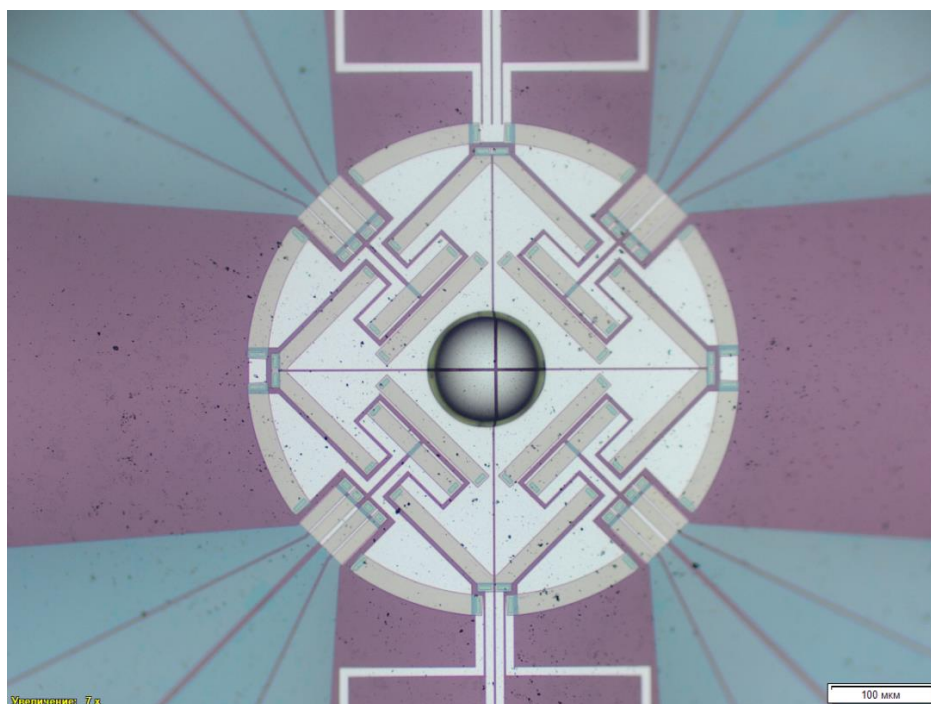


Рисунок 13 – Капля глицерина на открытом калориметрическом чип сенсоре. В правом нижнем углу приведена размерная шкала 100 мкм.

Размер образца определяет возможность повторных измерений. В случае капель малого размера заметная потеря массы обнаруживается уже после выполнения двух нагревов до 140°C , поэтому для каждого измерения использовался новый образец. Однако поскольку масса и геометрия каждого нового образца различны, воспроизводимость кинетических экспериментов оказывается относительно низкой. Удельная потеря массы при использовании крупных образцов невелика, поэтому крупные образцы можно было использовать повторно. Изотермическое выдерживание при 50°C в течение 600 с между измерениями позволяло достичь практически полного восстановления теплового эффекта анфолдинга белка. При выполнении кинетических экспериментов с одним образцом воспроизводимость результатов была хорошей.

Для улучшения разрешения прибора в некоторых экспериментах на референсную ячейку калориметрического сенсора наносили каплю чистого глицерина. В результате можно добиться выравнивания тепловых потерь в ячейках образца и сравнения, что уменьшает кривизну базовой линии.

2.2.3 Термомодулированная калориметрия со ступенчатым нагревом

Метод ТМДСК со ступенчатым нагревом реализован на капиллярном дифференциальном калориметре NanoDSC (TA Instrumets) и сверхбыстрых сканирующих калориметрах Flash DSC1 и Flash DSC2+ (Mettler Toledo) с применением открытых чип-калориметров UFS1 и жидкостных чипов NanoLiq Xen-39400.

По экспериментальным зависимостям температуры и теплового потока от времени рассчитывалась комплексная теплоемкость образца на частотах, кратных частоте модуляции $\omega = 2\pi/\tau$, где τ – период модуляции (сумма длительностей динамического и изотермического сегментов). Для расчета комплексной теплоемкости написана программа.

2.2.4 Спектроскопия кругового дихроизма

Состояние третичной структуры лизоцима в воде и смесях воды с диметилсульфоксидом отслеживалось по сигналу в ароматической области спектра КД от 270 до 310 нм. Спектры измеряли на спектрометре кругового дихроизма J-1500 (Jasco, Токио, Япония). Использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 мм. Температура контролировалась с помощью термодпары, погруженной в раствор. Температурная погрешность после калибровки термодпары составляет ± 1 К. Спектры регистрировали в режиме пошагового сканирования со временем интегрирования сигнала 2 с, с шириной щели 2 нм, итоговый спектр получался усреднением трех проходов. В ходе экспериментов с нагревом сигнал КД получали на фиксированной длине волны при времени интегрирования сигнала 8 с, скорость нагрева составляла $1 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$ в режиме непрерывного нагрева.

2.2.5 ИК спектроскопия

ИК-Фурье спектры регистрировали в диапазоне от $1\ 000$ до $4\ 000 \text{ см}^{-1}$ с шагом 2 см^{-1} на спектрометре Vertex-70 (Bruker, Биллерика, Массачусетс, США). Использовались стекла CaF_2 с прокладками, толщина прокладок

регулировалась для достижения оптимального соотношения сигнал/шум. Каждый спектр являлся результатом накопления 128 сканов. Для анализа вторичной структуры использовались разностные спектры в диапазоне от 1580 до 1750 см⁻¹, полученные путем вычитания спектра растворителя из спектра белка, для исключения полос поглощения растворителя.

Образцы для ИК-Фурье измерений готовили путем растворения лизоцима в тяжелой воде или смеси тяжелая вода-ДМСО; после растворения начинает происходить обмен протонов в белке на дейтроны. Для достижения полного изотопного обмена растворы нагревали до 70°C и выдерживали в течение 15 минут. В отдельном эксперименте ДСК было подтверждено, что такая термическая обработка не приводит к изменению состояния белка, т.е. никаких изменений кривой денатурации ДСК по сравнению с необработанным белком не отмечается.

2.2.6 Метод динамического светорассеяния

Наличие агрегатов в растворах лизоцима отслеживалось с помощью метода динамического светорассеяния. Измерения проводились на приборе Zetasizer Nano ZS (Малверн, Великобритания) при температуре 35°C. Прибор работает на гелий-неоновом лазере мощностью 4 мВт с длиной волны 633 нм и оснащен оптикой неинвазивного обратного рассеяния (NIBS). Измерения проводились при угле обнаружения 173 градуса.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Анализ необратимой денатурации модельного белка лизоцима методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния

Несмотря на то, что лизоцим является одним из наиболее исследованных белков, прямое использование литературных данных не всегда продуктивно по причинам различий реализуемых методик и неидентичности состава изучаемых систем (наличие или отсутствие буфера, добавок и т.д.). Для развития новых подходов желательно опираться на воспроизводимые и проверенные данные. Как упоминалось в литературном обзоре, нагрев лизоцима в калориметрическом эксперименте ведет к искажениям формы калориметрических кривых при повторных экспериментах. Применение в настоящей работе лизоцима в качестве модельного белка вызывает потребность в детальном анализе этого явления. Поэтому первым этапом работы стало определение характеристик лизоцима из белка куриных яиц комбинацией сканирующей калориметрии, спектральных методов и метода динамического светорассеяния.

3.1.1 Калориметрическое исследование необратимой денатурации лизоцима

На Рисунке 14 показаны кривые ДСК лизоцима в воде, зарегистрированные в серии циклов нагрев-охлаждение. Видно снижение высоты основного пика анфолдинга (с максимумом при $\sim 77^\circ\text{C}$) и рост низкотемпературного эндотермического эффекта (максимум при $\sim 67^\circ\text{C}$), аналогично результатам [198] и [190].

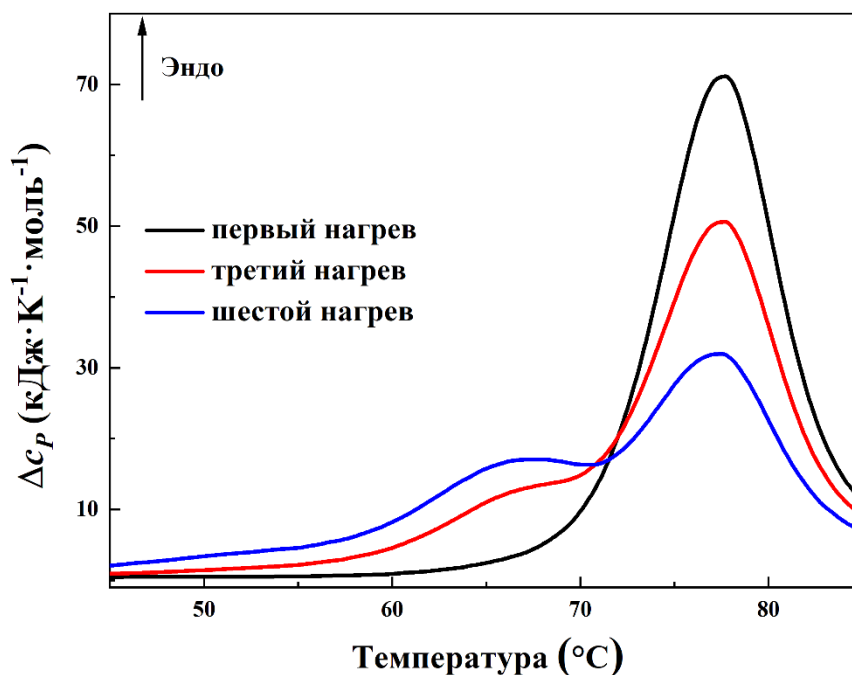


Рисунок 14 – Калориметрические кривые нагрева водных растворов лизоцима, полученные в ходе выполнения последовательных циклов нагрева и охлаждения со скоростью 1 К/мин.

Похожее явление наблюдается, если перед съемкой кривых ДСК образец белка выдерживался в термостате при повышенной температуре. Было проведено две серии экспериментов. В одной серии растворы помещались на одинаковое время при разных температурах (изохронные эксперименты), в другой – растворы инкубировались при одинаковой температуре в течение разного времени (изотермические эксперименты).

Калориметрические кривые нагрева лизоцима после часового выдерживания при 75, 80, 85 и 90°C в воде и смеси вода-ДМСО показаны на Рисунке 15 А-Г. Как видно из графиков, повышение температуры изотермического выдерживания приводит к уменьшению основного пика анфолдинга. Интересно, что выдерживание лизоцима при повышенных температурах в смеси ДМСО-вода с мольной долей ДМСО $x_{\text{ДМСО}}=0,3$ не дает таких же "бимодальных" ДСК кривых, вместо этого происходит расширение и уменьшение высоты калориметрического пика.

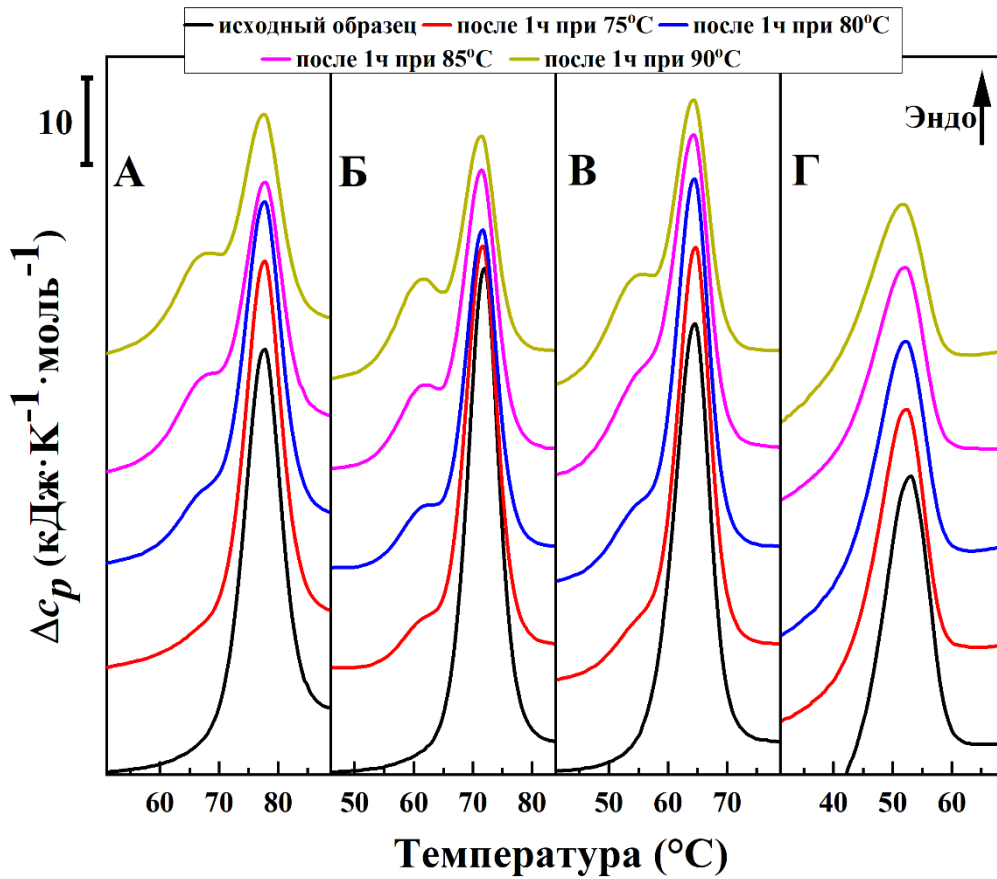


Рисунок 15 – Калориметрические кривые нагрева растворов лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО до и после изотермического выдерживания в течение 1 часа при температурах 75, 80, 85, 90°C. Кривые показаны без вычитания базовой линии и для наглядности сложены вертикально. Мольная доля ДМСО А) $x_{\text{ДМСО}}=0$; Б) $x_{\text{ДМСО}}=0,1$; В) $x_{\text{ДМСО}}=0,2$; Г) $x_{\text{ДМСО}}=0,3$.

Для изучения протекания во времени процессов, при термической обработке лизоцима, мы измерили ДСК кривые лизоцима в воде и смеси ДМСО-вода после выдерживания в течение 1-3 часов (Рисунок 16 А-Г) при температуре 85°C.

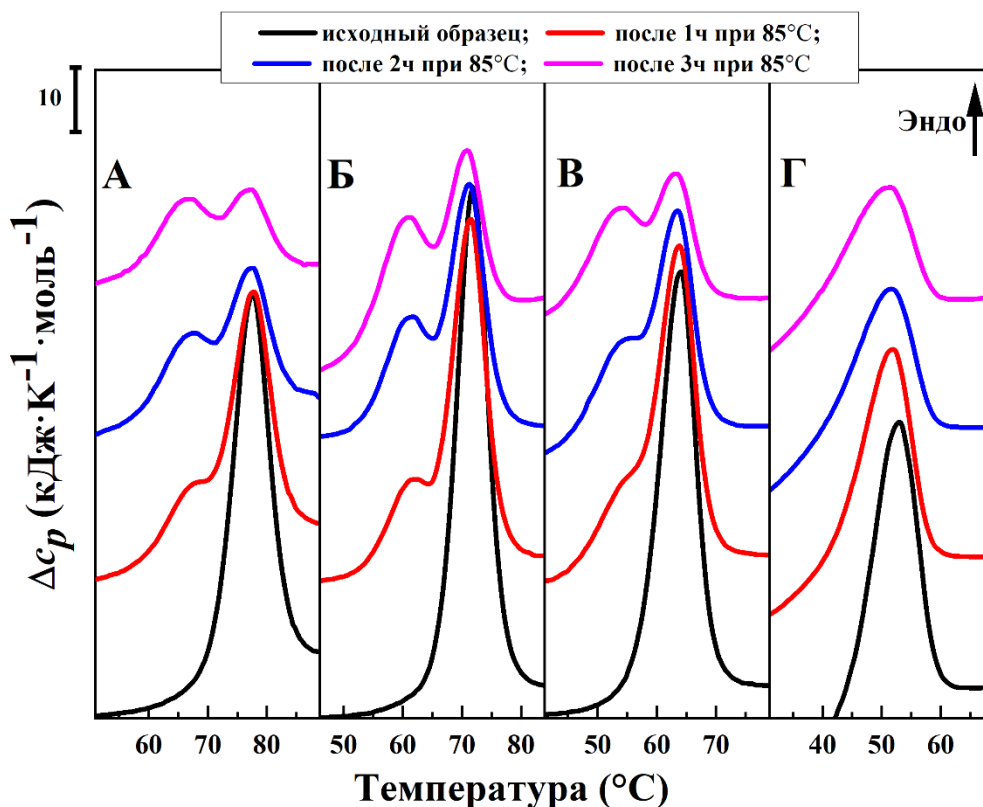


Рисунок 16 – Калориметрические кривые нагрева растворов лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО до и после изотермического выдерживания при 85°C в течение различного времени. Кривые показаны без вычитания базовой линии и сложены вертикально. Мольная доля ДМСО А) $x_{\text{ДМСО}}=0$; Б) $x_{\text{ДМСО}}=0,1$; В) $x_{\text{ДМСО}}=0,2$; Г) $x_{\text{ДМСО}}=0,3$.

Изотермическое выдерживание лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО с мольной долей ДМСО не более 0,2 приводит к постепенному снижению высоты пика высокотемпературной денатурации и увеличению низкотемпературного пика. В смесях с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ термическая обработка приводит к расширению и уменьшению высоты основного калориметрического пика денатурации без явной "бимодальной" формы.

Появление и последующий рост величины дополнительного низкотемпературного эффекта указывает на растущее содержание формы лизоцима с меньшей термостабильностью, при этом содержание исходной формы белка уменьшается, что видно по снижению величины основного эффекта. Таким образом, повышение температуры или увеличение

продолжительности высокотемпературного выдерживания ведут к необратимой денатурации лизоцима.

3.1.2 Исследование необратимой денатурации лизоцима методами ИК-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма и динамического светорассеяния

Для того чтобы понять, как необратимая денатурация сказывается на структуре лизоцима, были зарегистрированы спектры кругового дихроизма (КД) и Фурье ИК-спектры растворов белка.

Спектры КД растворов лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО приведены на Рисунке 17. Сравнение спектров кругового дихроизма до и после термической обработки лизоцима в воде свидетельствует об отсутствии значимых изменений в форме полосы КД ароматических групп белка (Рисунок 17 А). В смеси вода-ДМСО, содержащей органический растворитель в количестве до $x_{\text{ДМСО}} = 0,2$, форма спектра КД также не претерпевает значительных изменений после термической обработки (Рисунок 17 Б, В). В смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ после термической обработки интенсивность полосы в ароматической области спектра заметно уменьшается (Рисунок 17 Г), а для состава $x_{\text{ДМСО}} = 0,4$ поглощение отсутствует уже при комнатной температуре, и регистрируется спектр КД развернутого белка (синяя линия на Рисунке 17 Г). Сигнал кругового дихроизма на графиках представлен в виде g -фактора [203], т.е. отношения дифференциальной оптической плотности циркулярно поляризованного света ($A_L - A_R$) к УФ-поглощению (A). Эта величина является безразмерной и не зависит от концентрации белка или длины оптического пути.

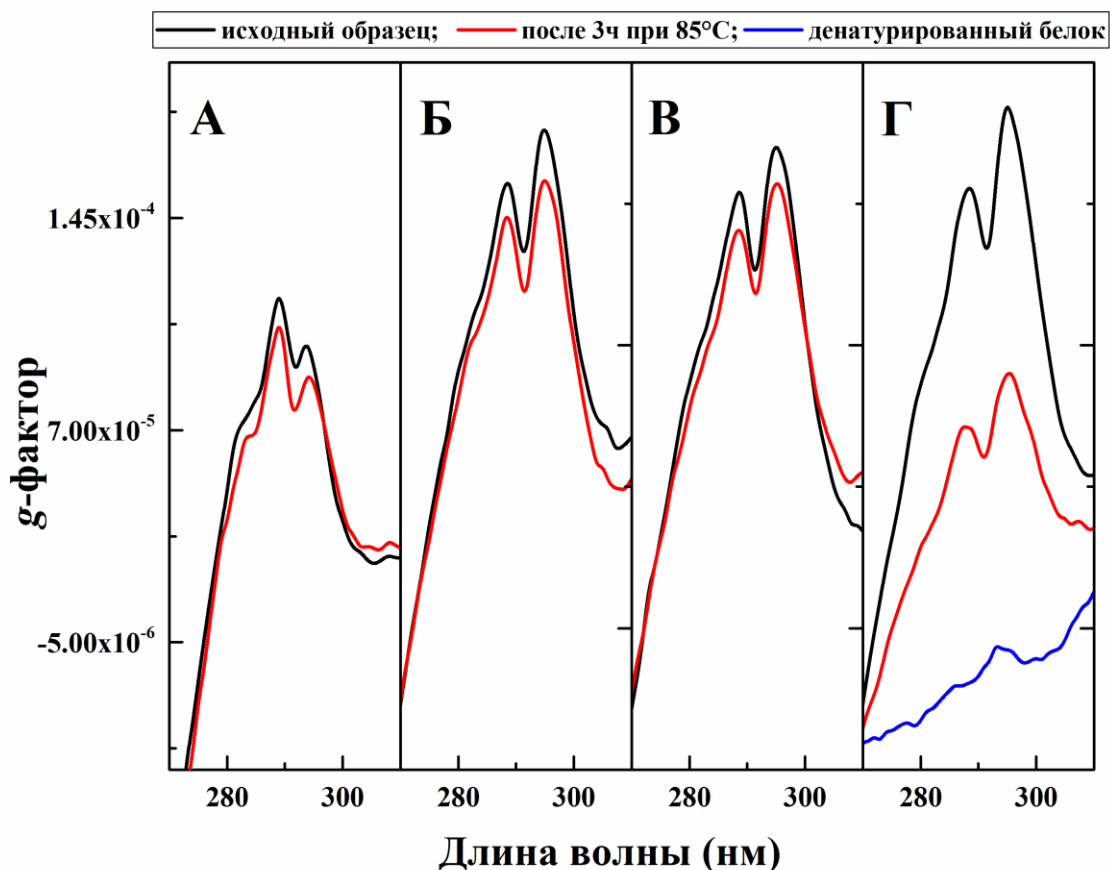


Рисунок 17 – Спектры кругового дихроизма растворов лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО в ароматической области до и после изотермического выдерживания при 85°C в течение 3 часов. Мольная доля ДМСО А) $x_{\text{ДМСО}}=0$; Б) $x_{\text{ДМСО}}=0,1$; В) $x_{\text{ДМСО}}=0,2$; Г) $x_{\text{ДМСО}}=0,3$. Черные линии представляют исходные спектры, полученные при комнатной температуре; красные линии представляют спектры после изотермического выдерживания при 85°C в течение 3ч, снятые после охлаждения до комнатной температуры. Синяя линия представляет собой спектр развернутого белка в смеси ДМСО-вода с $x_{\text{ДМСО}}=0,4$ при комнатной температуре.

Таким образом, по данным спектроскопии кругового дихроизма можно заключить, что формы белка с пониженной термической стабильностью имеют при комнатной температуре близкую к нативной конформацию третичной структуры.

Вместе с тем, температурные зависимости сигнала КД при 289 нм для растворов лизоцима в воде и смеси вода-ДМСО с мольным содержанием $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ до предварительной термической обработкой и после (Рисунок 18

А-Б) демонстрируют различие в термической стабильности форм белка, также как и calorиметрические кривые.

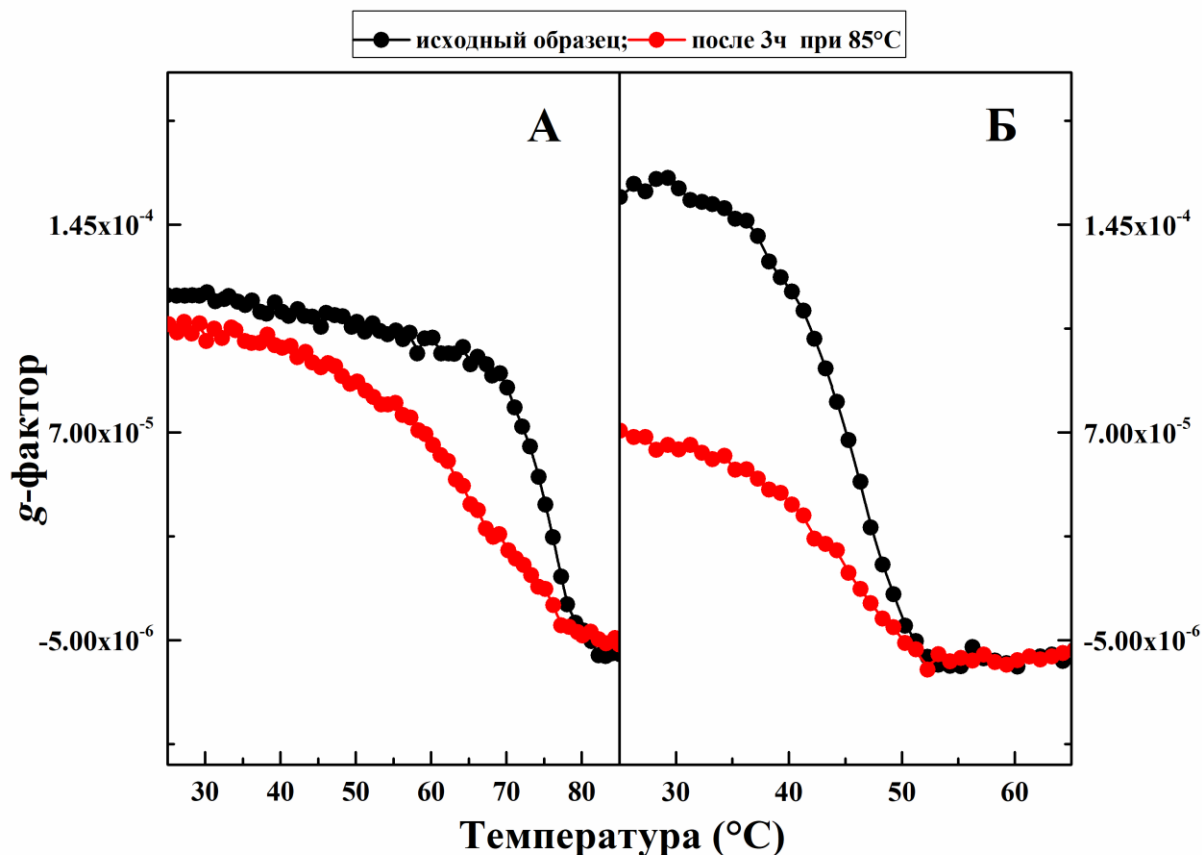


Рисунок 18 – Температурные зависимости КД-сигнала (g -фактора) раствора лизоцима при 289 нм до (черным цветом) и после (красным цветом) изотермического выдерживания при 85 °C в течение 3 ч. А) $x_{\text{ДМСО}}=0$, Б) $x_{\text{ДМСО}}=0,3$.

На Рисунке 19 А,Б приведены производные температурных зависимостей КД-сигнала. Для обработки полученных результатов производные были сглажены с помощью фильтра Савицкого-Голея 2-го порядка по 8 экспериментальным точкам. Видно, что форма полученных кривых отлично согласуется с результатами измерений ДСК

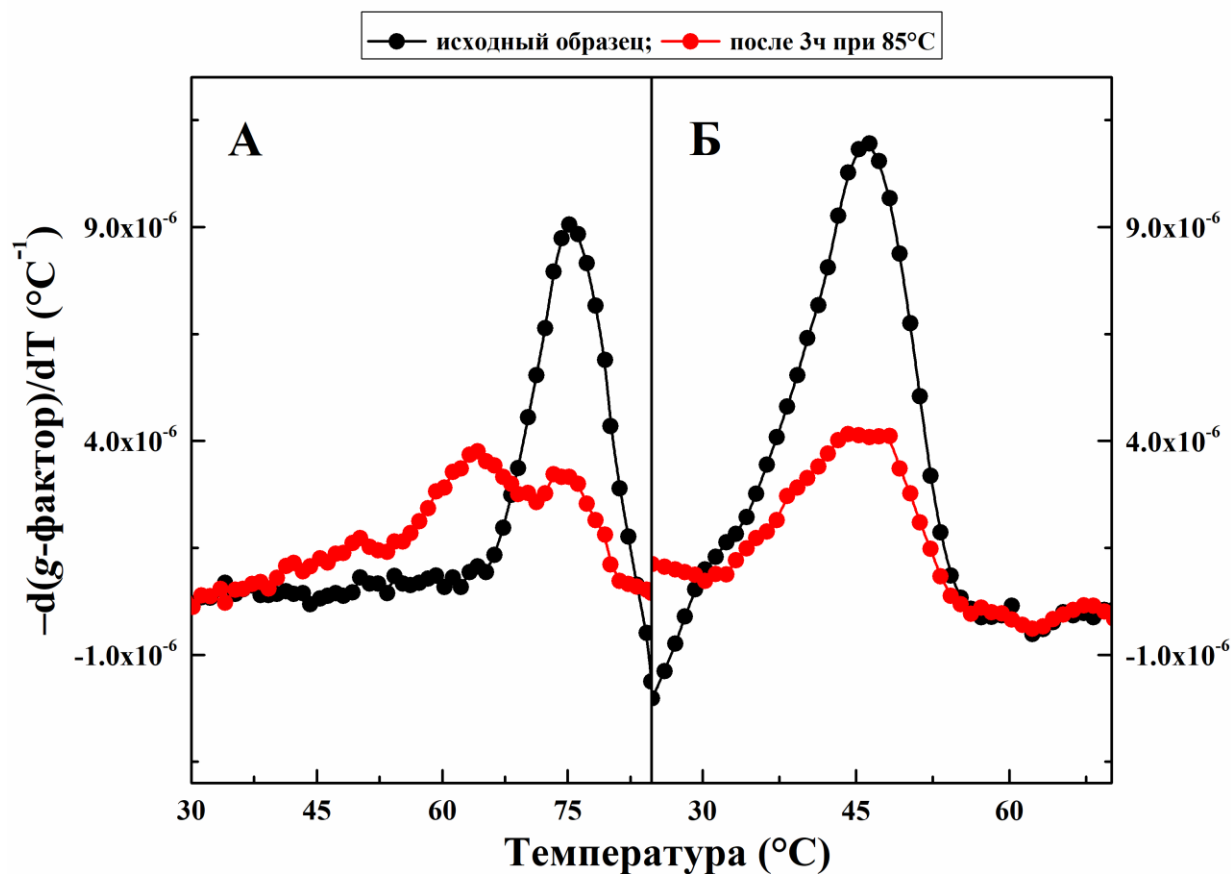


Рисунок 19 – Температурные производные КД-сигналов, приведенных на Рисунке 18. А) $x_{\text{ДМСО}} = 0$, Б) $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$.

ИК-спектры лизоцима в тяжелой воде и смеси тяжелой воды с ДМСО показывают, что после термической обработки лизоцима не происходит существенных изменений в форме полосы амид I (Рисунок 20 А-Г). Таким образом, состояние вторичной структуры лизоцима остается неизменным после высокотемпературного выдерживания.

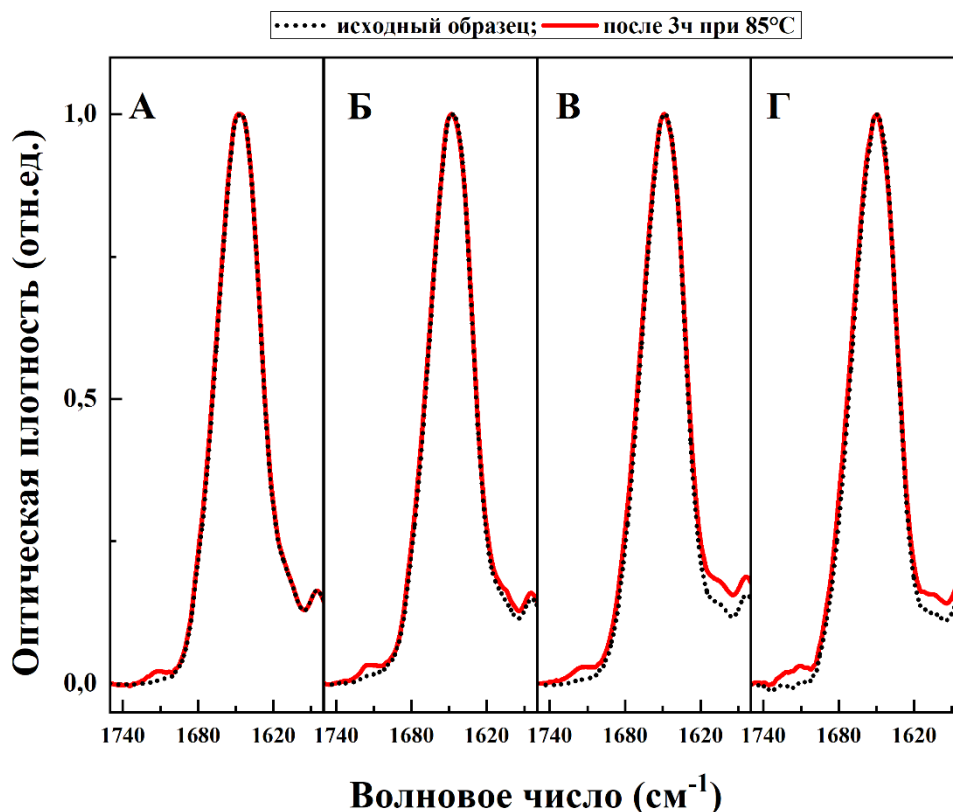


Рисунок 20 – ИК-спектры растворов лизоцима в тяжелой воде и смесях D_2O -ДМСО в области поглощения полосы амид I, зарегистрированные до и после изотермического выдерживания при $85^\circ C$ в течение 3 ч. Мольная доля ДМСО А) $x_{\text{ДМСО}} = 0$; Б) $x_{\text{ДМСО}} = 0,1$; В) $x_{\text{ДМСО}} = 0,2$; Г) $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$. Черным цветом отмечены исходные спектры, полученные при комнатной температуре; красные линии – спектры после изотермического выдерживания при $85^\circ C$ в течение 3ч, зарегистрированные после охлаждения до комнатной температуры.

В то же время после высокотемпературного выдерживания на ИК-спектрах становится заметна слабая боковая полоса (Рисунок 21) с центром при 1713 см^{-1} . Интенсивность этой полосы растет с увеличением продолжительности термической обработки. Кроме того, в смеси воды с ДМСО заметно увеличение поглощения в спектральной области от 1620 см^{-1} и ниже.

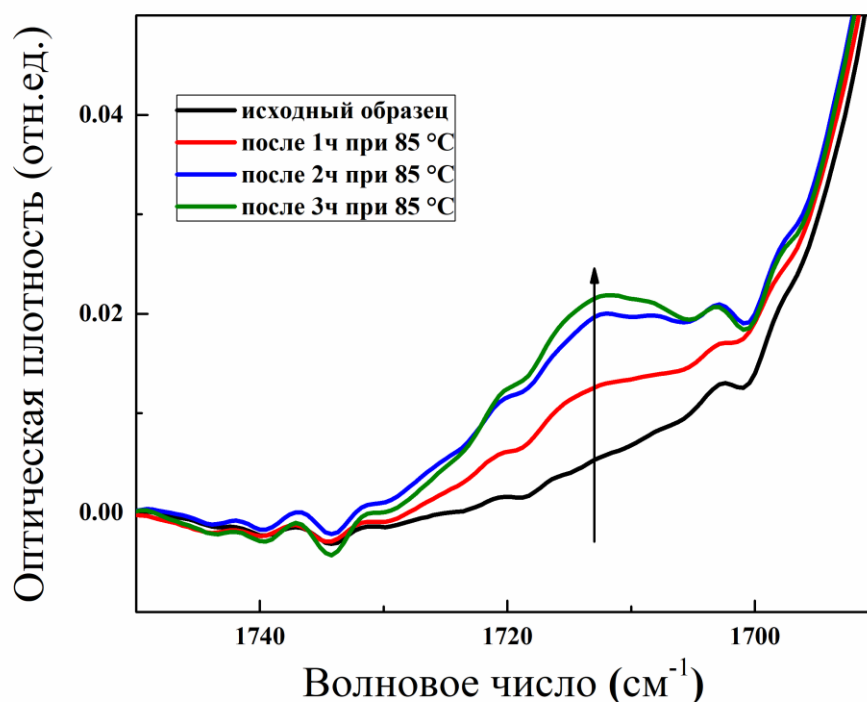


Рисунок 21 – Влияние продолжительности изотермического выдерживания при 85°C на интенсивности поглощения свободных карбоксильных групп лизоцима в тяжелой воде по данным ИК-спектроскопии.

Результаты измерений динамического светорассеяния показали, что влияние состава смеси вода-ДМСО на тенденцию лизоцима к агрегации является немонотонным. В чистой воде и в растворе с $x_{\text{ДМСО}}=0,1$ лизоцим присутствует, преимущественно, в мономерной форме. При увеличении содержания ДМСО до $x_{\text{ДМСО}}=0,2$ в растворе появляется незначительное число небольших олигомерных форм лизоцима, а при дальнейшем увеличении содержания ДМСО до $x_{\text{ДМСО}}=0,3$ белок снова становится почти полностью мономерным. Вместе с тем, после выдерживания при высокой температуре не было замечено изменений в распределении белковых частиц по размерам. В частности, численная доля молекул лизоцима в мономерной форме, т.е. с гидродинамическим радиусом около 1 нм, близка к 100% даже после 3 часов изотермического выдерживания при 85°C во всех исследованных растворах. При этом наблюдается некоторое снижение ζ -потенциала, характеризующего

заряд белковой молекулы. Таким образом, появление низкотемпературного пика на калориметрических кривых белка не связано с образованием агрегатов белковых молекул.

3.1.3 Механизм необратимой денатурации лизоцима

Бимодальный характер кривых ДСК (Рисунок 14, Рисунок 15 А-В, Рисунок 16 А-В), зарегистрированных в воде и смесях вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} \leq 0,2$ указывает на гетерогенность популяции молекул белка. Постепенное уменьшение высоты основного калориметрического пика с ростом продолжительности изотермического выдерживания (Рисунок 16 А-В) или температуры выдерживания (Рисунок 15 А-В) соответствует уменьшению количества нативного белка после высокотемпературного воздействия, в то время как остальные молекулы белка переходят в необратимо денатурированное состояние с пониженной термостабильностью. Более длительное высокотемпературное выдерживание приводит к увеличению кривизны калориметрических кривых в области низких температур (ниже 55°C в воде), что указывает на растущую долю менее структурированных форм белка.

Кривые ДСК лизоцима, полученные в смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$, заметно отличаются от кривых, полученных для более низких концентраций ДМСО. После изотермического выдерживания при 85°C низкотемпературные пики не развиваются, а интенсивность основного калориметрического пика уменьшается, при этом увеличивается его ширина (Рисунок 16 Г). КД-спектры лизоцима в смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ (Рисунок 17 Г, красная линия) показывают более выраженное снижение интенсивности ароматической полосы в КД-спектре по сравнению со смесями с содержанием ДМСО $x_{\text{ДМСО}} \leq 0,2$. Температурная зависимость интенсивности сигнала КД при 289 нм, зарегистрированная для смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ (Рисунок 19 Б),

аналогична кривым ДСК (Рисунок 15 Г, Рисунок 16 Г), т.е. дополнительный низкотемпературный пик не развивается.

Наблюдаемые различия могут быть результатом другого механизма необратимой денатурации в смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$, но также результатом наложения эффектов анфолдинга нативного и необратимо денатурированных состояний. Чтобы выбрать между этими двумя гипотезами, мы сравнили результаты экспериментов, представленные на следующей схеме (Схема 1 А-Г). В одном случае белок подвергается высокотемпературному воздействию в смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$, а затем разбавляется водой до конечного содержания $x_{\text{ДМСО}} = 0,1$, в другом – лизоцим выдерживается при повышенной температуре непосредственно в смеси с $x_{\text{ДМСО}} = 0,1$. После этого сравниваются калориметрические кривые растворов белка.

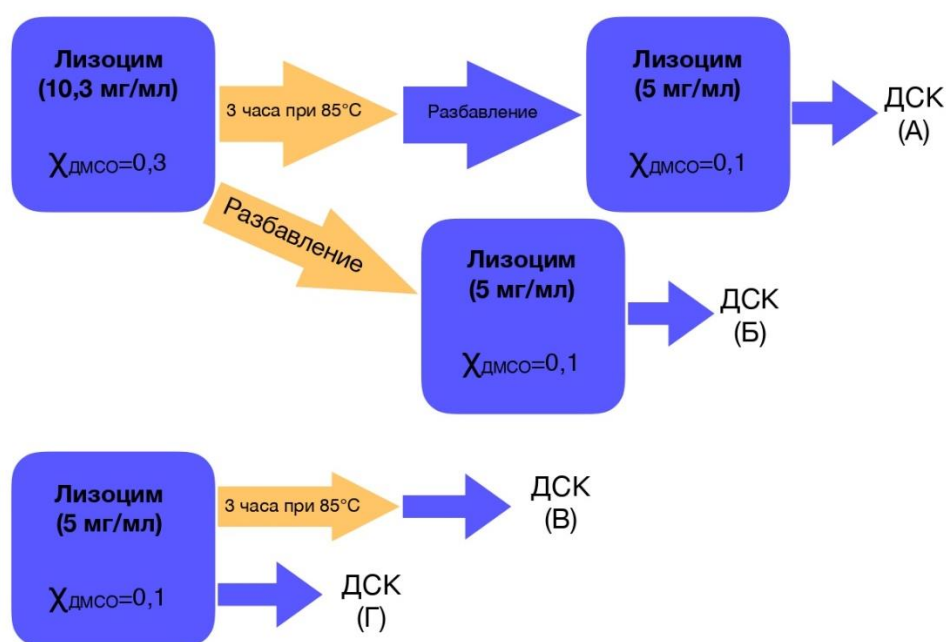


Схема 1 – Схема калориметрического эксперимента по проверке состояния лизоцима после изотермического выдерживания в смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$.

Как видно из Рисунка 22, кривые ДСК, полученные для растворов лизоцима, приготовленных по схеме А (раствор лизоцима с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ подвергнутый изотермическому выдерживанию при 85°C в течение 3 часов, был охлажден до 298 K и разбавлен до $x_{\text{ДМСО}} = 0,1$) и В (раствор лизоцима с

$x_{\text{ДМСО}} = 0,1$, подвергнутый изотермическому выдерживанию при 85°C в течение 3 часов, и охлажденный до 298 K), очень похожи. Это означает, что процессы, приводящие к необратимой денатурации белка, аналогичны для смесей ДМСО с водой как с высоким, так и с низким содержанием органического растворителя. То есть, после термической обработки в смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ также образуется гетерогенная популяция белка, состоящая из нативного белка и некоторого количества необратимо денатурированных молекул.

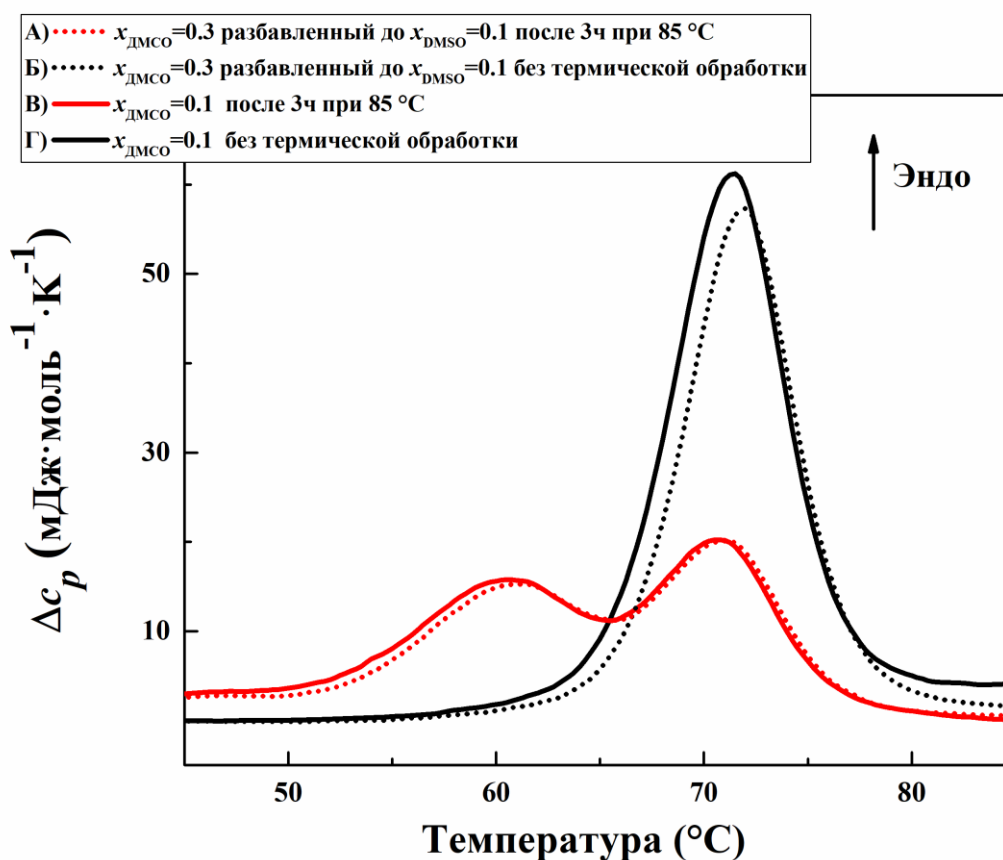


Рисунок 22 – Калориметрические кривые нагрева растворов лизоцима в смеси вода-ДМСО, скорость нагрева 1 K/мин . Сплошные линии представляют ДСК кривые для растворов, полученных прямым растворением лизоцима в смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,1$. Пунктирные линии представляют собой ДСК кривые растворов, приготовленных после разбавления смеси вода-ДМСО с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ до $x_{\text{ДМСО}} = 0,1$. Черные линии представляют собой калориметрические кривые растворов без термической обработки. Красные линии – калориметрические кривые растворов, подвергнутых изотермическому выдерживанию при 85°C в течение 3 часов. Обозначения А-Г соответствуют Схеме 1.

Таким образом, расширение пика анфолдинга после выдерживания при повышенной температуре в растворах с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$ может означать, что эффект анфолдинга необратимо денатурированного белка перекрывается с эффектом анфолдинга нативного лизоцима, то есть разница между температурами пиков становится менее выражена с ростом концентрации ДМСО.

Понимание механизма необратимой денатурации получено при анализе более тонкой информации из ИК-спектров с Фурье преобразованием. Боковая полоса при 1713 см^{-1} в ИК-спектрах термически обработанных растворов лизоцима (Рисунок 21) соответствует $\nu(\text{C=O})$ валентным колебаниям карбоксильной группы остатков аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu) кислот [64], которая образуется в результате дезамидирования боковых цепей Asn (аспарагина) и Gln (глутамин). Существует обширная литература по теме дезамидирования белков, например, [204–206], и, в частности, лизоцима [27,39,192,207]. Однако, в работах [27,39,192,207] протекание дезамидирования не сопоставлялось с появлением дополнительного низкотемпературного пика на калориметрических кривых. А в работе [192] хотя и отмечено снижение величины теплового эффекта анфолдинга лизоцима в результате дезамидирования, но появление дополнительного калориметрического эффекта не было отмечено, кроме того, не изучалась структура дезамидированных форм белка, а также кинетические параметры процесса необратимой денатурации.

Увеличение интенсивности боковой полосы с ростом продолжительности термической обработки, как показано на Рисунке 21, согласуется с уменьшением высокотемпературного пика ДСК и ростом низкотемпературного пика. Таким образом, низкотемпературные пики, появляющиеся на ДСК кривых лизоцима после воздействия повышенных температур, можно связать с анфолдингом белковых форм с пониженной термостабильностью, вероятно, образующихся в результате дезамидирования. Другие химические модификации белка, например рацемизация, гидролиз

связи Asp-X, β -элиминирование S-S групп, которые мы не можем полностью исключить, также могут вызывать необратимую денатурацию [27,39].

В случае смесей ДМСО с водой также заметны изменения в ИК-области с волновыми числами ниже 1620 см^{-1} . Поглощение в этой области может быть приписано колебаниям заряженных карбоксильных групп [64], что согласуется с появлением плеча вблизи 1713 см^{-1} . Полоса протонированных карбоксильных групп не видна в спектре, вероятно, из-за протоноакцепторных свойств ДМСО, которые стимулируют депротонирование карбоксила.

Как было сказано выше, наблюдения, проведенные с помощью метода динамического светорассеяния, позволяют исключить агрегацию белка как причину изменения термостабильности. В то же время, наблюдаемое снижение ξ -потенциала может также быть объяснено протеканием процесса дезамидирования, поскольку в результате него положительно заряженные группы заменяются отрицательно заряженными.

Таким образом, по крайней мере на начальных стадиях необратимой термической денатурации лизоцима куриного белка, появляются дезамидированные формы белка с пониженной термостабильностью, сохраняющие структуру, близкую к нативной.

3.1.4 Кинетические параметры необратимой денатурации белка

Анализ калориметрических кривых лизоцима после изотермического выдерживания при разных температурах и с различной продолжительностью позволил определить изменение доли нативного белка.

Как обсуждалось выше, воздействие повышенной температуры на раствор лизоцима приводит к уменьшению высоты калориметрического пика анфолдинга нативного белка и появлению дополнительного низкотемпературного пика (или уширению пика в смеси ДМСО-вода с $x_{\text{ДМСО}} = 0,3$). Площадь высокотемпературного калориметрического пика, соответствующего разворачиванию нативного белка, может быть

использована в качестве меры количества нативного белка. Для того чтобы определить площадь этого пика отдельно от пика плеча, необходимо провести деконволюцию кривой ДСК. Однако деконволюция может быть надежно выполнена только в том случае, если создана надежная базовая линия. В нашем случае кривые ДСК белка после термической обработки имеют значительную кривизну в низкотемпературной области, что затрудняет подбор базовой линии (Рисунок 23). С другой стороны, кривые почти линейны в высокотемпературной области после пика, и наклон очень близок для всех кривых. В результате долю нативной структуры можно оценить по высоте высокотемпературного калориметрического пика, измеренной по отношению к базовой линии, экстраполированной из высокотемпературной области кривых ДСК. Такой анализ исключает проблему неоднозначности построения базовой линии во всем температурном диапазоне.

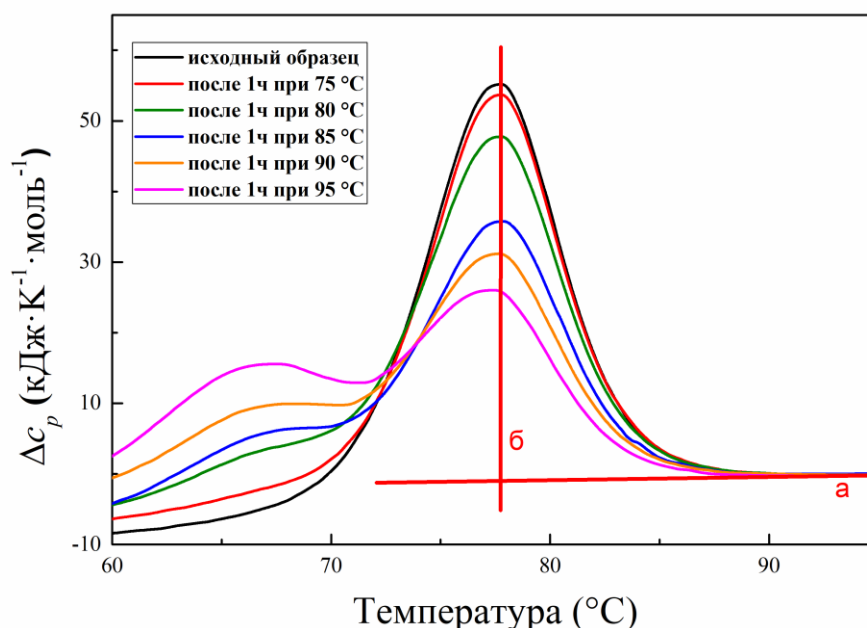


Рисунок 23 – Калориметрические кривые нагрева растворов лизоцима в воде до и после предварительного изотермического выдерживания при повышенной температуре, скорость нагрева 1 К/мин. Красная линия (а) - экстраполяция теплоемкости денатурированной формы лизоцима на основе высокотемпературной области кривых ДСК, красная линия (б) - положение калориметрического пика нативного белка, по которому рассчитывалось содержание нативной формы.

Доля молекул с нативной структурой (δ) рассчитывалась как отношение высоты пика после изотермического выдерживания к высоте пика исходного раствора. Такой метод вносит некоторую систематическую ошибку, так как высота пика нативной структуры недооценивается в полностью нативном белке из-за кривизны базовой линии, в то время как в случае денатурированного белка высота основного пика может быть переоценена из-за перекрытия с низкотемпературным пиком. Однако мы считаем эти эффекты менее значительными по сравнению с неопределенностями, возникающими при деконволюции без надежной базовой линии.

Временные зависимости доли оставшегося нативного белка (δ), определенные из изотермических экспериментов при 85°C, были описаны кинетическими уравнениями первого порядка (Рисунок 24) для определения константы скорости денатурации (Таблица 1).

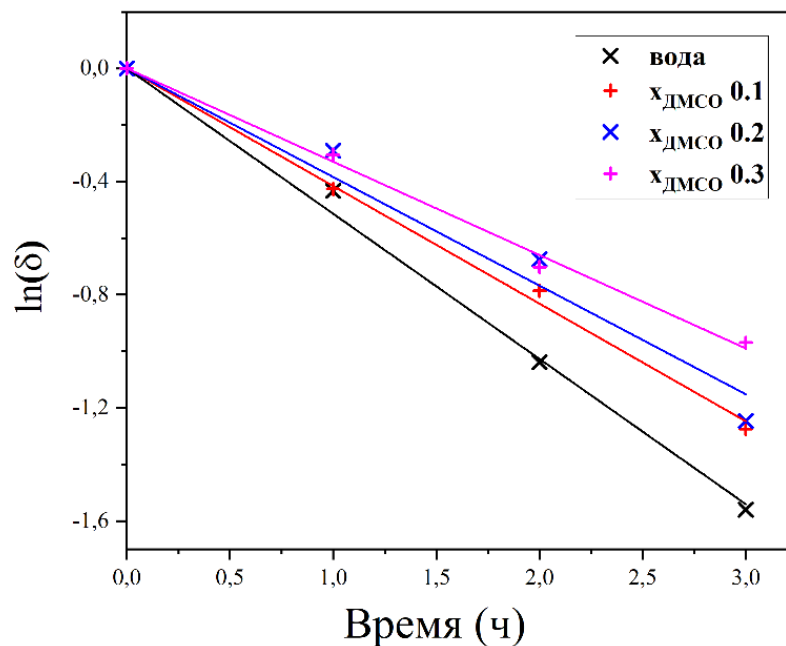


Рисунок 24 – Зависимость доли оставшегося нативного белка (δ) от времени выдерживания при 85°C.

Таблица 1. Константы скорости денатурации при 85°C.

$x_{\text{ДМСО}}$	Константа скорости, ч^{-1}
0	$0,50 \pm 0,05$
0,1	$0,41 \pm 0,02$
0,2	$0,39 \pm 0,06$
0,3	$0,33 \pm 0,02$

$x_{\text{ДМСО}}$ - мольная доля ДМСО в смеси ДМСО-вода, относительная стандартная ошибка концентрации растворов $u_r(x_{\text{ДМСО}})=0,02$ (кроме $x_{\text{ДМСО}}=0$, точное значение), стандартная ошибка значений температуры $u(T)=1$ К, неопределенность константы скорости представлена расширенным среднеквадратичным отклонением (уровень доверия 0,95). Эксперименты проводились при давлении $p=0,1$ МПа, стандартная ошибка значений давления $u(p)=0,01$ МПа.

Необходимо отметить, что константа скорости необратимой денатурации становится меньше с увеличением содержания ДМСО.

Энергия активации необратимой денатурации может быть оценена на основании изохронных экспериментов следующим образом. Предполагая кинетический механизм денатурации первого порядка, т.е.

$$-\frac{\ln(\delta)}{\tau} = k \quad (9)$$

где δ - доля нативной структуры, k - константа скорости денатурации, τ - время, можно заменить значение константы скорости ее температурной зависимостью по уравнению Аррениуса. Это дает следующее уравнение:

$$-\frac{\ln(\delta)}{\tau} = A \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad (10)$$

где E_A - энергия активации, A - предэкспоненциальный коэффициент, T - абсолютная температура, R - универсальная газовая постоянная. Логарифмируя обе части уравнения, его можно привести к линейному виду:

$$\ln\left(-\frac{\ln(\delta)}{\tau}\right) = \ln(A) - \frac{E_A}{RT} \quad (11)$$

Таким образом, зависимость доли нативного белка от температуры выдерживания при фиксированной длительности должна приводиться к

линейному виду в координатах $\ln\left(-\frac{\ln(\delta)}{\tau}\right) - \frac{1}{T}$, причем наклон, пропорционален энергии активации. Соответствующий график представлен на Рисунке 25; найденные значения энергии активации приведены в таблице (Таблица 2).

Зависимости доли нативного белка от температуры выдерживания в смесях вода-ДМСО дают близкие значения эффективной энергии активации (Таблица 2). В случае же водного раствора зависимость выглядит как комбинация двух линейных трендов. Следует отметить, что температура денатурации лизоцима в нейтральном водном растворе составляет $77,9^{\circ}\text{C}$, так что белок находится в основном в нативном состоянии при 75°C и полностью денатурирован при 85°C и выше. Таким образом, часть зависимости при более низких температурах отражает энергию активации денатурации нативного белка, которая оказывается выше, чем у развернутого белка.

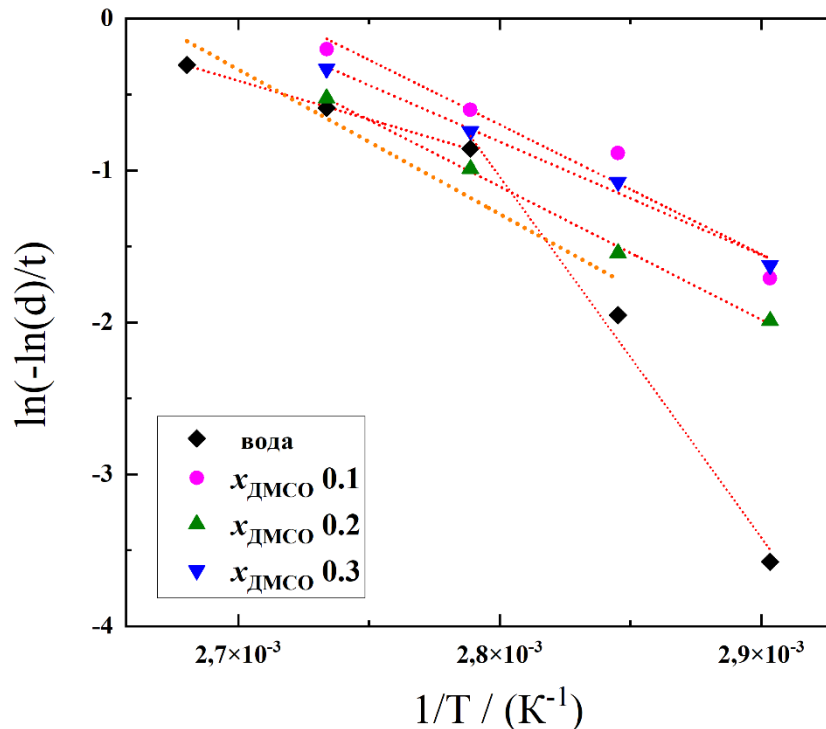


Рисунок 25 – Оценка эффективной энергии активации денатурации по данным изохронных экспериментов. Пунктирные линии показывают линейные аппроксимации.

Таблица 2. Энергии активации необратимой денатурации, определенные из изохронных экспериментов

$x_{\text{ДМСО}}$	Температурный диапазон, °С	Эффективная энергия активации, кДж/моль
0	75 – 85	283±60
0	80 – 95	113±60
0	85 – 95	60±3
0,1	75 – 90	101±32
0,2	75 – 90	104±10
0,3	75 – 90	88±11

Более высокое значение кажущейся энергии активации в воде в диапазоне температур от 75°С до 85°С может объясняться затрудненным процессом дезамидирования нативных молекул белка, которые вероятно имеют большую конформационную жесткость, по сравнению с развернутыми. Этот результат согласуется с литературными данными, показывающими замедление дезамидирования добавками, стабилизирующими нативное состояние [39,192].

Как было показано ранее на Рисунке 24 и в таблице (Таблица 1), добавление ДМСО постепенно замедляет деградацию белка, при этом кажущаяся энергия активации процесса необратимой денатурации практически одинакова во всех смесях вода-ДМСО. Такое поведение можно объяснить, если скорость-лимитирующая стадия включает реакцию гидролиза, что действительно имеет место в процессе дезамидирования, когда сукцинимидный интермедиат превращается в Asp (Glu) [208]. Если состав растворителя выразить как $x_{\text{вода}}$, то наблюдается линейная зависимость скорости необратимой денатурации от содержания воды (Рисунок 26). Зависимость имеет свободный член близкий к нулю, таким образом, замедление денатурации в смесях ДМСО-вода, по-видимому, является концентрационным эффектом.

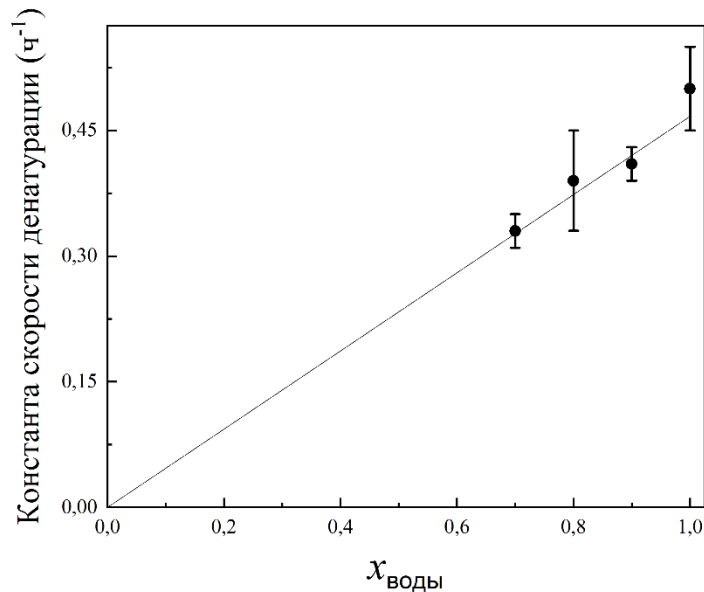


Рисунок 26 – Зависимость константы скорости необратимой денатурации лизоцима (Таблица 2) от содержания воды в смеси ДМСО-вода. Линия представляет собой линейную аппроксимацию экспериментальных точек (коэффициент $r^2 = 0,99872$).

Представленные результаты и методики подробно обсуждаются в работе [209].

Таким образом, анализ характеристик модельного белка лизоцима позволил указать на дезамидирование, как основную причину медленной необратимой денатурации белка, а сопоставление результатов спектроскопических методов и дифференциальной сканирующей калориметрии показывает, что метод ДСК способен обнаруживать изменения состояния белка даже когда спектроскопические методики не показывают значительных изменений нативной конформации. Вместе с тем, небольшие скорости нагрева, доступные капиллярным калориметрам, используемым для исследования растворов белка, ограничивают возможности метода в области анализа кинетики процессами, протекающими во временном диапазоне от десятков минут до часов, тогда как процессы анфолдинга/фолдинга занимают всего лишь секунды и даже доли секунды. Значительное повышение скоростей нагрева и охлаждения может предоставить, как минимум, два преимущества – позволит изучать кинетику быстрых процессов обратимого анфолдинга и

фолдинга, минимизирует протекание медленных необратимых процессов денатурации. В связи с перечисленным, представляет интерес разработка подходов для изучения процессов анфолдинга/фолдинга белка на основе сверхбыстрой калориметрии.

3.2 Исследование процессов анфолдинга и фолдинга лизоцима с помощью сверхбыстрой калориметрии

3.2.1 Изотермический фолдинг лизоцима в глицерине

Традиционно фолдингом называют процесс сворачивания полипептидной цепи *in vivo*, происходящий после биосинтеза или же одновременно с ним. В литературе термин фолдинг также используется при описании перехода белков из неупорядоченного в свернутое состояние *in vitro*. Как было показано в литературном обзоре, в ходе экспериментальных исследований кинетики фолдинга *in vitro* наблюдают за сворачиванием белка из предварительно развернутого состояния, то есть, фактически изучается процесс рефолдинга. При этом нет общепринятого разграничения между этими терминами. В дальнейшем мы используем термин фолдинг белка, подразумевая процесс рефолдинга белка после анфолдинга.

Для наблюдения за восстановлением нативной структуры лизоцима проведены эксперименты со скачками температуры по Схеме 2. Искключительно быстрые скорости сканирования, доступные методу сверхбыстрой калориметрии, позволяют произвести нагрев за время, намного меньшее чем длительность процесса фолдинга.

Измерения выполняли на калориметрическом чип-сенсоре UFS1 открытого типа. Малый размер образца приводит к интенсивному испарению летучих веществ, поэтому исследования водных растворов белка на таком сенсоре невозможны. В нашей работе мы исследовали процесс фолдинга лизоцима куриного белка в глицерине.

Известно, что естественной средой для процесса фолдинга белка является вода, тем не менее было продемонстрировано, что денатурированный и восстановленный лизоцим сворачивается, образует правильные S-S связи и приобретает структуру, подобную нативной в 99,5% глицерине [210], хотя степень восстановления оказалась ниже, чем в чистой воде. Кроме того, при нагреве раствора лизоцима в глицерине на калориметрической кривой ДСК наблюдаются эндотермические эффекты анфолдинга [142].

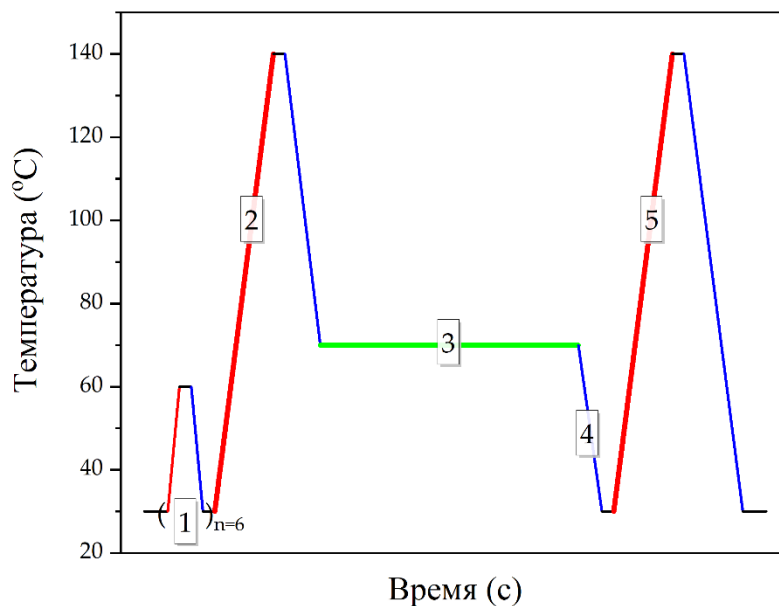


Схема 2 – Временной профиль температуры при исследовании фолдинга лизоцима в глицерине методом сверхбыстрой калориметрии. 1) циклы нагрев/охлаждение для уравнивания системы; 2) первый нагрев со скоростью 1000 K/c; 3) изотермическое выдерживание на изотерме, в ходе которого протекает процесс фолдинга, температура и длительность сегмента варьировались; 4) охлаждение, необходимое для проведения последующего нагрева с той же начальной температурой, что и первый нагрев; 5) второй нагрев со скоростью 1000 K/c (если не указано иначе), по которому определялись свойства белкового ансамбля, формирующегося на стадии 3. Длительность промежуточных изотерм (за исключением сегмента 3) составляла 0,1 с.

Схема эксперимента состоит из следующих стадий. Вначале белковый раствор подвергается серии быстрых циклов нагрев-охлаждение (со скоростью 500 K/c) с промежуточными изотермами 0,1 с при начальной

температуре чип-сенсора (обычно 25°C) и верхней температуре 70°C для обеспечения стабильности состава образца (сегмент 1). Исходный раствор белка может содержать остаточную воду, которая испаряется во время таких циклов нагрев-охлаждение.

После достижения стабильного состава (что контролируется по величине сигнала на калориметрических кривых нагрева и охлаждения) образец лизоцима нагревается. В ходе нагрева регистрируется эффект анфолдинга белка (сегмент 2), затем образец быстро охлаждается до заданной температуры фолдинга (охлаждение осуществлялось со скоростью 1000 К/с). После изотермического выдерживания образца при этой температуре в течение заданного времени (сегмент 3) выполняется повторный нагрев (сегмент 5) для анализа калориметрического сигнала от ансамбля белковых молекул, сформировавшегося на стадии (3). Дополнительные сегменты охлаждения перед измерительными сканами нагрева (сегмент 4) требуются, когда температура на изотерме (3) выше начальной температуры чип-сенсора.

В методе сверхбыстрой сканирующей калориметрии прямое измерение массы образца невозможно. Поэтому первый нагрев (сегмент 2) не только создает «развернутое» состояние белка в образце, но и является мерой количества белка в образце, поскольку величина эффекта анфолдинга пропорциональна количеству белка.

Применение температурной программы, представленной на Схеме 2 позволяет получить информацию о термодинамическом состоянии неравновесного белкового ансамбля – совокупности развернутых и свернутых молекул и, возможно, промежуточных структур, образующихся в процессе фолдинга.

Размеры образца лизоцима определяются выбором скорости сканирования во время первого и второго нагревов. В зависимости от поставленных задач скорость нагрева варьировалась в диапазоне от 10 до 2 000 К/с. Увеличение разрешения прибора и улучшение качества базовой линии

достигались размещением капли чистого глицерина сопоставимого размера на референсную ячейку калориметрического сенсора, Рисунок 27.

При коротких временах выдерживания при постоянной температуре на кривой повторного нагрева отсутствуют какие-либо эффекты. Это означает, что белок не успевает восстановить исходную структуру. После длительного изотермического выдерживания на калориметрической кривой повторного нагрева отчетливо виден эндотермический эффект при той же температуре, что и на первом нагреве, что говорит о восстановлении структуры белка.

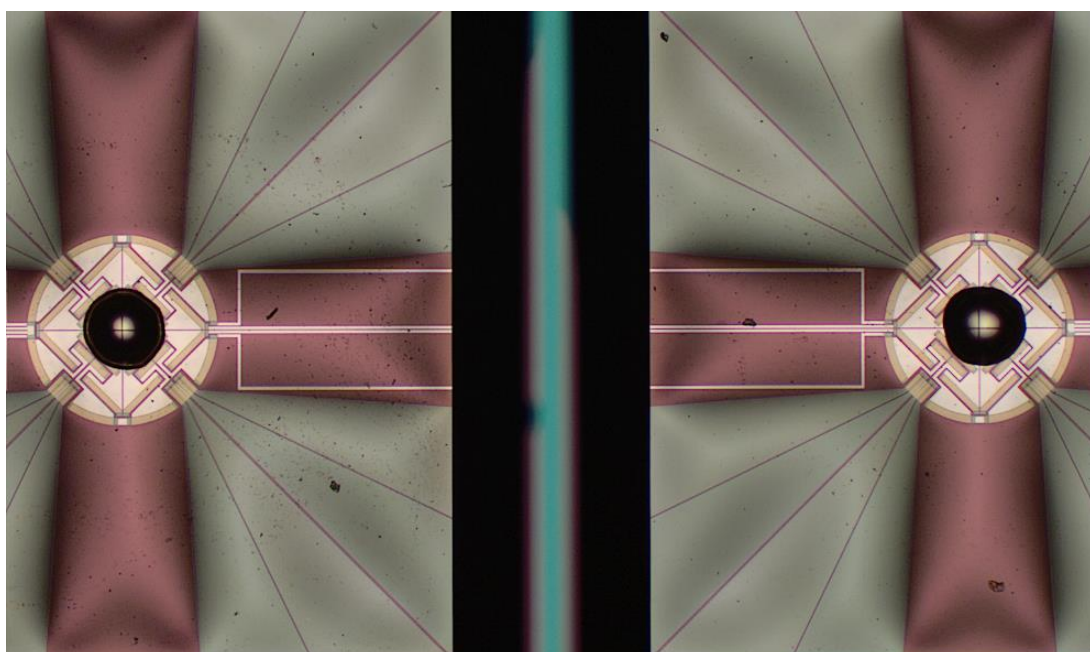


Рисунок 27 – Пример нанесения двух капель образца на калориметрический чип-сенсор – лизоцима, растворенного в глицерине (слева) и чистого глицерина (справа) для улучшения величины соотношения сигнал/шум на калориметрических кривых.

Примеры калориметрических кривых исходного образца и повторного нагрева после изотермического выдерживания показаны на Рисунке 28 А,Б.

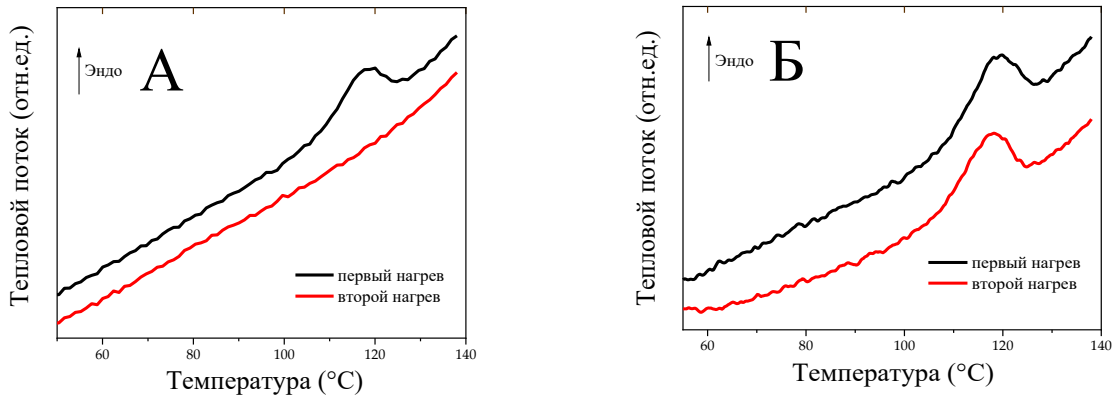


Рисунок 28 – Калориметрические кривые нагрева образцов лизоцима в глицерине, полученные по Схеме 2. Первый (сегмент 2) и второй (сегмент 5) нагревы – черным и красным цветом, соответственно; рисунок (А) изотерма 1 с при 20°С (сегмент 3) и (Б) 600 с при 50°С.

Сравнение формы калориметрических кривых первого и второго нагревов с изотермическим выдерживанием в течение 600 с при 50°С после поправки на базовую линию показывает, что эндотермический эффект почти полностью восстанавливается (Рисунок 29 А). Такое же восстановление теплового эффекта анфолдинга наблюдается при других температурах, однако, необходимое для восстановления эффекта время отличается (12 минут выдерживания при 30°С, Рисунок 29 Б). Отсутствие уширения эффекта и появления каких-либо дополнительных пиков означает высокую обратимость анфолдинга и отсутствие агрегации. Последнее подтверждается результатами измерений методом динамического рассеяния света, в которых не было обнаружено агрегации лизоцима в глицерине даже после длительного нагрева [139].

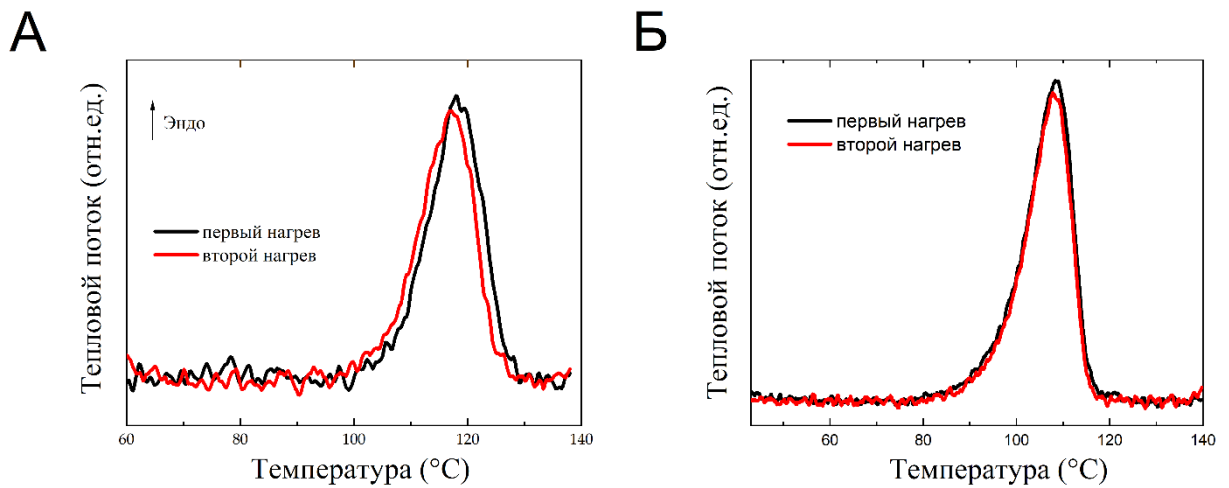


Рисунок 29 – Калориметрические кривые первого (сегмент 2 на Схеме 2) и второго нагревов (сегмент 5 на Схеме 2) после вычитания базовой линии (А) – с изотермой при 50°C в течение 600 с, (Б) – с изотермой при 30°C в течение 720 с, скорость нагрева 100 К/с (сегмент 3 на Схеме 2).

Вместе с тем при промежуточной длительности изотермического выдерживания, когда эндотермический пик анфолдинга восстанавливается не полностью, часто наблюдается дополнительный низкотемпературный пик. Пример такого поведения представлен на Рисунке 30 А, а сравнение калориметрических кривых после вычитания базовой линии – на Рисунке 30 Б. Обращает на себя внимание, что основной пик сохраняет аналогичную ширину и форму, но с меньшей высотой. Наблюдаемый дополнительный низкотемпературный тепловой эффект на кривых сверхбыстрого калориметра не является результатом необратимой денатурации, поскольку с увеличением длительности изотермического выдерживания он полностью исчезает. Поэтому этот низкотемпературный эффект можно связать с формированием интермедиата в ходе фолдинга лизоцима в глицерине. Термическая стабильность интермедиата понижена по сравнению с основной (нативной) формой белка.

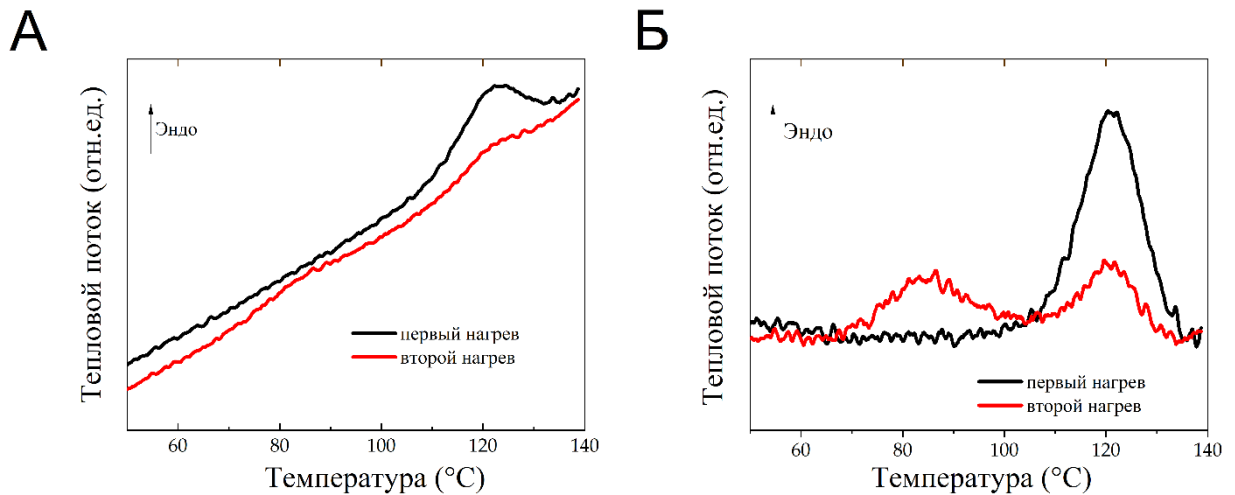


Рисунок 30 – Калориметрические кривые первого (сегмент 2 на Схеме 2) и второго (сегмент 5 на Схеме 2) нагревов с изотермическим выдерживанием 60 с при 30°C (сегмент 3 на Схеме 2). (А) – исходные калориметрические кривые и (Б) - после вычитания базовой линии.

Для сравнения результатов измерений различных образцов, площади пиков, полученных при втором сканировании (сегмент 5), нормировали на площадь пика, полученного при первом сканировании (сегмент 3). Удавалось провести несколько измерений с одним и тем же образцом, восстанавливая содержание нативного белка до исходного количества путем изотермического выдерживания при 50°C в течение 600 с. Для обеспечения хорошего соотношения сигнал/шум использовались образцы большего размера со скоростью нагрева на первом и втором сканированиях 100 К/с. Результаты измерения площади пика после изотермического выдерживания при различных температурах показаны на Рисунке 31. Изменение площади основного пика можно описать кинетическим уравнением первого порядка для определения кажущейся константы сворачивания лизоцима в чистом глицерине.

Кинетика фолдинга при изотермическом выдерживании

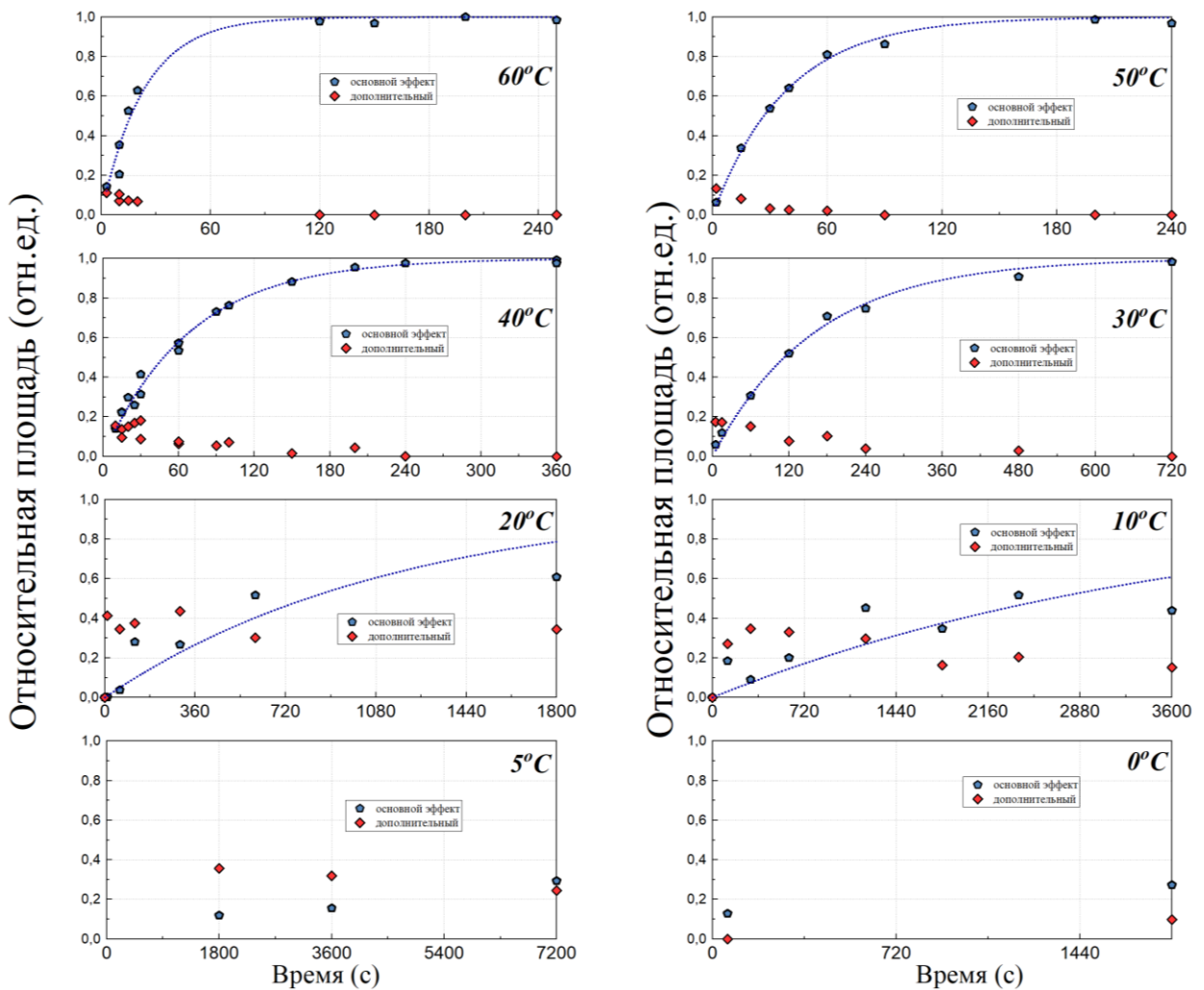


Рисунок 31 – Зависимость относительной площади основного и низкотемпературного пиков от длительности изотермического выдерживания при температурах 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60°C (сегмент 3 на Схеме 2). Величина относительной площади, отложенная по вертикальной оси, представляет собой отношение площади калориметрического пика на втором нагреве к площади пика на первом нагреве. Точки на графике соответствуют экспериментальным значениям, пунктирная линия – аппроксимация зависимости площади основного пика от времени кинетической кривой первого порядка.

Несколько другая картина наблюдается если изотермическое выдерживание осуществлять при температуре 70°C. В этом случае дополнительный низкотемпературный эффект не наблюдается (Рисунок 32 А,Б). Этот эксперимент проводился со скоростью нагрева 1 000 К/с для меньшего образца, чтобы избежать образования интермедиатов во время

нагрева от начальной температуры сканирования 30°C. Полученный результат позволяет предположить существование дополнительного пути фолдинга без образования интермедиата. В зависимости от скорости нагрева температура дополнительного эффекта составляет 85 - 95°C.

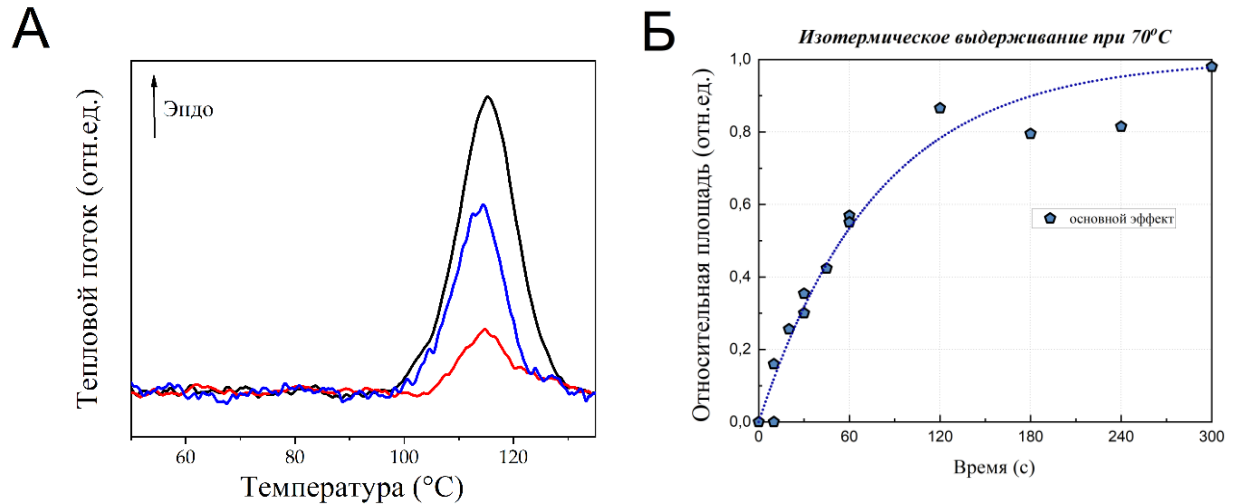


Рисунок 32 – Результаты экспериментов по фолдингу лизоцима в глицерине при 70°C (сегмент 3 на Схеме 2). (А) – калориметрические кривые, соответствующие первому нагреву и следующим после изотермического выдерживания при 70°C после вычитания базовой линии. На рисунке А черная линия – первый нагрев, синяя – нагрев после 60 с изотермического выдерживания, красная – нагрев после 25 с при 70°C. (Б) – зависимость относительной площади основного пика на калориметрических кривых от длительности изотермического выдерживания при 70°C.

Учитывая, что температура эффекта анфолдинга повышается за счет высоких скоростей нагрева, можно считать, что в изотермических условиях интермедиат фолдинга не является стабильным при 70°C, поэтому процесс сворачивания не может в этих условиях проходить через образование интермедиата, то есть существует параллельный «прямой» путь фолдинга. Ниже механизм фолдинга обсуждается более подробно.

3.2.2 Механизм фолдинга лизоцима в глицерине

Полученные методом сверхбыстрой калориметрии кинетические кривые фолдинга лизоцима в глицерине дают возможность проанализировать

механизм этого процесса. На основе полученной температурной зависимости эффективной кинетической константы фолдинга лизоцима в глицерине можно оценить значение эффективной энергии активации этого процесса (Рисунок 33).

Как видно из Рисунка 33 температурная зависимость эффективной константы фолдинга демонстрирует «нормальное» Аррениусовское поведение (константа увеличивается с ростом температуры) при температурах от 10 до 50°C с кажущейся энергией активации 92 ± 6 (кДж/моль). Однако в интервале от 50 до 70°C температурное поведение оказывается анти-Аррениусовским.

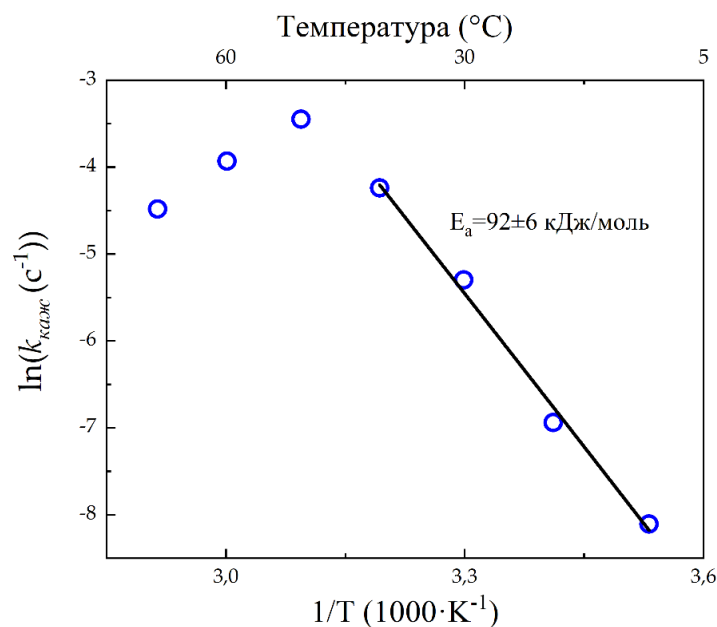
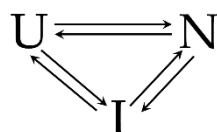


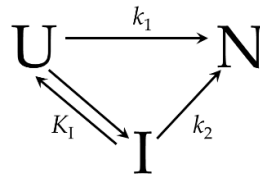
Рисунок 33 – График Аррениуса для эффективной константы процесса фолдинга лизоцима в глицерине по данным сверхбыстрой калориметрии. Величины кажущейся константы скорости фолдинга получены на основе данных, представленных на Рисунках 31 и 32.

Это можно объяснить с помощью «треугольной» кинетической модели, т.е. схемой, имеющей следующий вид:



где U – «развернутый» белок, N – правильно свернутый белок, I – интермедиат фолдинга.

При температурах от 70°C и ниже равновесной формой лизоцима является свернутая форма. Поэтому реакции, ведущие к этой форме, можно считать при этих температурах необратимыми (кинетические константы, ведущие к свернутой форме, намного больше, чем константы обратных процессов). Образование промежуточного продукта, однако, может контролироваться обратимой реакцией с соответствующей константой равновесия. Мы будем считать процесс квазиравновесным, то есть скорость установления равновесия между развернутой и промежуточной формами намного быстрее, чем скорости процессов, ведущих к свернутой форме. Упрощенная схема процесса будет выглядеть следующим образом:



Таким образом, формирование нативного белка будет аппроксимироваться следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{dN}{d\tau} = k_1U + k_2I = k_1U + k_2K_IU = (k_1 + k_2K_I)U \quad (12)$$

Если $k_1 < k_2$, то при температурах, где промежуточный продукт уже термически нестабилен ($K_I \rightarrow 0$), температурная зависимость скорости сворачивания может выглядеть анти-Аррениусовской.

Фолдинг лизоцима в воде также протекает несколькими путями [79,182], а в качестве минимальной кинетической модели была предложена треугольная схема [182]. Образование промежуточного продукта, по-видимому, определяется формированием дисульфидных связей, как было показано в исследовании молекулярного моделирования [211]. Таким образом, найденный механизм сворачивания лизоцима в глицерине совпадает с механизмом сворачивания этого же белка в воде, описанным в литературе. Это с одной стороны указывает на адекватность применения сверхбыстрой калориметрии для исследования фолдинга, а с другой показывает, что

глицерин может быть использован как неводный растворитель – аналог воды, по крайней мере для некоторых белков.

Метод сверхбыстрой калориметрии позволяет не только изучить кинетику процесса фолдинга лизоцима в глицерине, но и оценить термостабильность образующегося неравновесного ансамбля молекул белка.

Полученные калориметрические кривые лизоцима в глицерине позволяют заметить, что форма пика анфолдинга нативной структуры лизоцима в глицерине не меняется в процессе фолдинга, варьируется только его высота. Это исключает некоторые из предложенных механизмов фолдинга белка, например, модель Цимма-Брэга, в которой неполностью свернутый белок представлен ансамблем частично свернутых молекул белка с разной степенью сворачивания. Можно оценить форму калориметрического пика анфолдинга таких гипотетических частично свернутых форм. Калориметрическая кривая анфолдинга частично свернутого интермедиата фолдинга может быть описана следующим уравнением [102,212,213]:

$$\frac{dH}{dT} = \frac{\Delta_{i,H}^U}{\beta} \frac{d[I_i]}{d\tau} = -\frac{\Delta_{i,H}^U}{\beta} k_i [I_i] \quad (13)$$

где $\Delta_{i,H}^U$ - энтальпия разворачивания i -го промежуточного продукта, k_i - константа скорости разворачивания i -го промежуточного продукта, $[I_i]$ - концентрация i -го промежуточного продукта, β - скорость нагрева во время сканирования, τ - время, T - температура. В первом приближении значение $\Delta_{i,H}^U$ можно считать не зависящим от температуры.

Зависимая от температуры константа анфолдинга может быть оценена на основе теории переходного состояния в соответствии с уравнением:

$$k_i = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S_i^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H_i^\ddagger}{RT}\right) \quad (14)$$

где ΔH_i^\ddagger - энтальпия активации i -го промежуточного продукта, ΔS_i^\ddagger - энтропия активации i -го промежуточного продукта, k_B и h - константы Больцмана и Планка, соответственно. Можно предположить, что существует набор промежуточных продуктов сворачивания с различными значениями

ΔH_i^\ddagger и таким же переходным состоянием между интермедиатом и полностью развернутым белком, как между нативной и полностью развернутой формами белка. Соответствующая энтальпия активации будет меньше на разницу энтальпий между промежуточным и нативным белком:

$$\Delta H_i^\ddagger = \Delta H_N^\ddagger - (\Delta_N^U H - \Delta_i^U H) = \Delta H_N^\ddagger - \Delta \Delta_i^N H \quad (15)$$

где $\Delta_N^U H$ - энтальпия разворачивания нативного белка, ΔH_N^\ddagger - энтальпия активации нативного белка, $\Delta \Delta_i^N H$ - разница между энтальпиями разворачивания i -го промежуточного и нативного белков. Мы также можем предположить, что энтропия активации промежуточного продукта пропорциональна энтальпии активации, и, таким образом

$$\Delta S_i^\ddagger = \Delta S_N^\ddagger \frac{\Delta H_i^\ddagger}{\Delta H_N^\ddagger} \quad (16)$$

где ΔS_N^\ddagger - энтропия активации нативного белка.

Энтальпия и энтропия активации анфолдинга нативного белка были оценены путем нелинейной аппроксимации экспериментальной кривой уравнением (14) и составили 228 кДж/моль и 370 Дж/моль·К (принимая трансмиссионный множитель за 1), соответственно.

Кривые анфолдинга гипотетических частично свернутых промежуточных продуктов изображены на Рисунке 34. Как видно из рисунков, промежуточные продукты имеют более низкие температуры калориметрического пика. Если белковый ансамбль содержит вклад от нескольких различных промежуточных структур белка, то комбинированная калориметрическая кривая будет представлять собой сумму вкладов всех присутствующих промежуточных структур. В связи с этим можно ожидать, что пик расширится, а положение максимума может сместиться в сторону более низких температур.

Однако в наших экспериментах мы наблюдаем только пик с той же температурой и шириной, что и при первом сканировании, и один низкотемпературный пик. Когда площадь основного пика восстанавливается не полностью, положение и форма пика все равно остаются идентичными

зафиксированным на первом нагреве. Этот факт означает, что энергетическое состояние, соответствующее свернутой структуре, уникально. Другими словами, следующие населенные состояния имеют довольно большую разницу в энтальпии и высокий барьер разворачивания. Таким образом, кинетика процесса определяется энтальпийными барьерами.

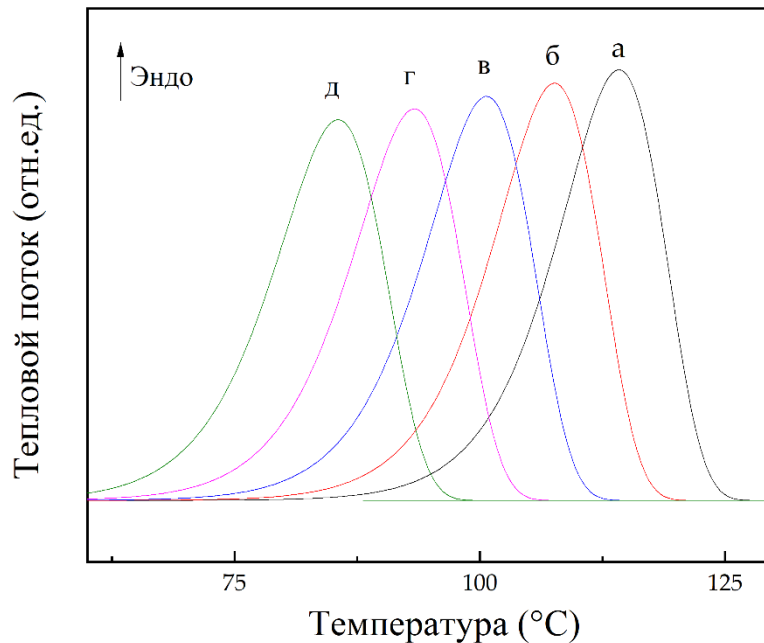


Рисунок 34 – Теоретические кривые нагрева белка со скоростью сканирования 100 К/с для разных комбинаций термодинамических и кинетических параметров анфолдинга. Кривая (а) для нативного белка получена путем численного интегрирования уравнения 13 с параметрами $\Delta_N^U H = 450$ кДж/моль, $\Delta N_N^\ddagger = 228$ кДж/моль, $\Delta S_N^\ddagger = 370$ Дж/моль·К; кривая (б) рассчитана с корректировкой параметров на $\Delta\Delta_{I_i}^N H = 10$ кДж/моль; кривая (в) – с корректировкой на $\Delta\Delta_{I_i}^N H = 20$ кДж/моль; кривая (г) – с корректировкой на $\Delta\Delta_{I_i}^N H = 30$ кДж/моль; кривая (д) – с корректировкой на $\Delta\Delta_{I_i}^N H = 40$ кДж/моль.

Также с помощью метода сверхбыстрой калориметрии можно определить эффективную энергию активации анфолдинга интермедиата. Для этого мы провели серию экспериментов, в которых варьировали скорости второго нагрева (сегмент 5 на Схеме 2). Температуры максимумов на калориметрической кривой зависят от скорости нагрева (β), и оценка этой

зависимости с помощью графика Киссинджера [141] позволяет получить кажущуюся энергию активации процессов, тепловой эффект которых наблюдается на калориметрической кривой. На Рисунке 35 показан график Киссинджера для температур основного и низкотемпературного калориметрических пиков. Угол наклона зависимостей определяется эффективной энергией активации процесса анфолдинга. Для основного пика эффективная энергия активации процесса анфолдинга составляет 240 ± 29 (кДж/моль), что согласуется с предыдущей оценкой [139], а для низкотемпературного пика эффективная энергия активации составляет 142 ± 14 (кДж/моль).

Численное моделирование низкотемпературного эндотермического эффекта в рамках одностадийной кинетической модели с константой, подчиняющейся уравнению Аррениуса, дает эффективное значение энергии активации 139 кДж/моль при хорошей сходимости с экспериментальной кривой теплового потока (Рисунок 36). Если температурную зависимость кинетической константы анфолдинга описывать в рамках теории переходного состояния, то энтальпия активации составляет 136 кДж/моль, а энтропия 174 Дж/моль·К (трансмиссионный множитель принят за 1).

Таким образом, энергетический барьер для разворачивания промежуточной формы примерно на 100 кДж/моль ниже, чем для конечной свернутой формы.

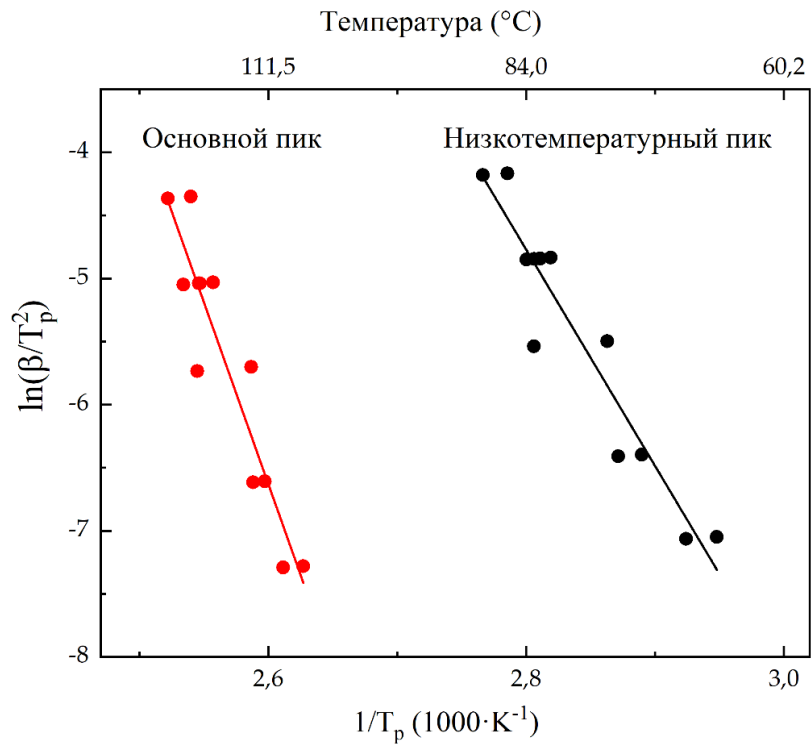


Рисунок 35 – График Киссинджера для температур максимума основного и низкотемпературного калориметрических пиков, полученный при варьировании скорости второго нагрева от 100 до 2 000 K/c в серии экспериментов с изотермой 60 с при 30°C.

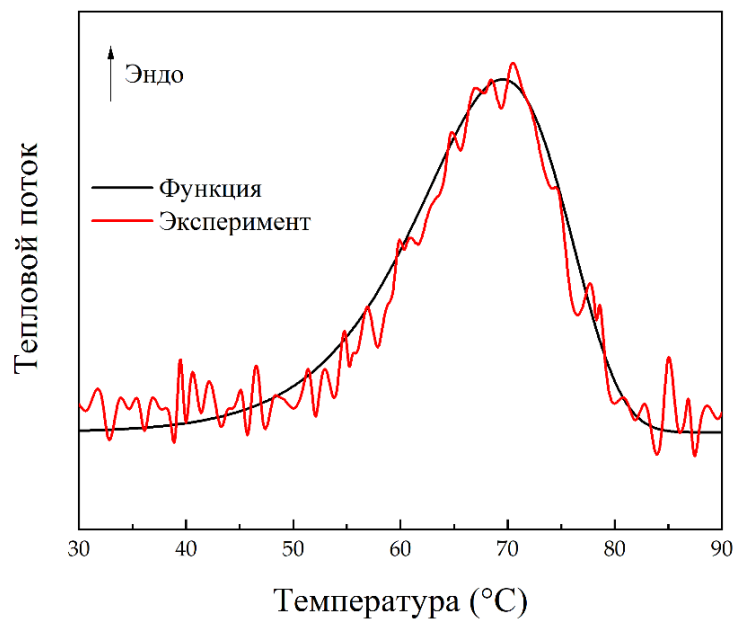


Рисунок 36 – Аппроксимация низкотемпературного калориметрического пика согласно кинетической модели $N \rightarrow U$. Кажущаяся энергия активации для моделированной кривой составляет 139 кДж/моль.

Наконец, можно оценить тепловой эффект анфолдинга интермедиата. К сожалению, молярная энтальпия разворачивания интермедиата не может быть точно рассчитана из имеющихся данных, так как для этого необходимо знать относительные количества промежуточной и свернутой форм, что невозможно, поскольку развернутая форма не дает эффектов на калориметрической кривой. Кроме того, для оценки энтальпии анфолдинга интермедиата нельзя использовать соотношение Вант-Гоффа, поскольку разворачивание во время сканирования при нагревании происходит в неравновесных условиях из-за высокой скорости нагрева. Однако можно определить нижнюю границу энтальпии разворачивания интермедиата.

Если считать, что общее количество молекул белка равно 1, то в любой момент времени $N + I + U = 1$. Таким образом, должно выполняться следующее неравенство:

$$\frac{\Delta H_1}{\Delta_N^U h} \geq \frac{\Delta H_{2,main}}{\Delta_N^U h} + \frac{\Delta H_{2,add}}{\Delta_I^U h} \quad (17)$$

где ΔH_1 - абсолютная энтальпия анфолдинга, зарегистрированная при первом нагреве, $\Delta H_{2,main}$ - абсолютная энтальпия анфолдинга основной формы белка, регистрируемая на втором нагреве, $\Delta H_{2,add}$ - абсолютная энтальпия дополнительной (низкотемпературной) формы, $\Delta_N^U h$ - молярная энтальпия разворачивания свернутой формы белка, $\Delta_I^U h$ - молярная энтальпия разворачивания свернутого промежуточного продукта. Неравенство выполняется только если $\Delta_I^U h$ больше некоторого значения.

Анализ всего объема экспериментальных данных дает безопасную оценку $\Delta_I^U h$, которая составляет не менее 70% от величины $\Delta_N^U h$.

Результаты измерений позволяют рассмотреть влияние чистого глицерина, как растворителя, на процесс сворачивания. Следует отметить, что в отличие от предыдущих исследований влияния глицерина на лизоцим [96,140,143,192,213–215] и другие белки, в настоящей работе окружение белка представляет собой полностью безводный глицерин. Весьма интересно, что полученные результаты демонстрируют сходство с результатами работ,

произведенных в воде [79,182,216]. Сопоставление показывает, что процесс сворачивания лизоцима в глицерине концептуально идет по тому же пути, что и в воде. Смеси воды и органических растворителей часто анализируют с точки зрения процессов преимущественной сольватации, однако поскольку в нашем случае растворителем является фактически безводный глицерин, эти эффекты можно не рассматривать. При этом кажущиеся константы сворачивания в глицерине ниже, чем в воде [140]. Как было показано в одной из работ [139], такие параметры, как энтальпия анфолдинга и кажущаяся энергия активации разворачивания лизоцима сходны в воде и глицерине. Значительно меньшая скорость сворачивания указывает на меньшую молекулярную подвижность белковой цепи и может быть результатом большей вязкости глицерина.

Результаты применения методики сверхбыстрой калориметрии для исследования кинетики анфолдинга и фолдинга лизоцима были представлены в статье [217].

Метод сверхбыстрой калориметрии имеет свои перспективы при исследовании анфолдинга/фолдинга белков в сравнении с традиционной ДСК, однако, имеет свои ограничения. Во-первых, применение открытых калориметрических сенсоров ограничивается практически нелетучими растворами. Во-вторых, определение молярной калориметрической энтальпии разворачивания в методе сверхбыстрой калориметрии, является сложным, хотя и возможным [139]. Существуют и закрытые калориметрические сенсоры, некоторые их применения описаны в литературе [137,138].

Более высокие скорости сканирования, доступные сверхбыстрой калориметрии, не только позволяют проводить эксперименты со скачком температуры для изучения белкового ансамбля в ходе фолдинга, но имеют и другие важные преимущества. Высокая скорость нагрева сокращает продолжительность воздействия высоких температур на раствор белка, тем самым уменьшая возможный вклад необратимой химической денатурации (например, в результате дезамидирования [209]) или агрегации. Еще одним

преимуществом метода сверхбыстрой калориметрии является небольшой размер образца.

Таким образом, выполненная работа демонстрирует возможность детального анализа механизма фолдинга белка на количественном уровне и оценки термостабильности неравновесной белковой системы с помощью метода сверхбыстрой калориметрии.

Вместе с тем, высокие скорости нагрева, реализуемые методом сверхбыстрой калориметрии, не позволяют напрямую определять равновесные термодинамические параметры процессов анфолдинга и фолдинга. При измерениях с относительно низкими для сверхбыстрой калориметрии скоростями нагрева (10 К/с и ниже) возникает проблема искажения формы калориметрической кривой. Для решения задач улучшения разрешения калориметрических кривых при относительно малых скоростях нагрева и реализации измерений в околоравновесных условиях были выполнены измерения процесса анфолдинга по методу термомодулированной ДСК со ступенчатым нагревом. Метод ТМДСК, основы которого приведены в разделе 1.3.2, позволяет разделить составляющие теплового эффекта, относящиеся к обратимым (у которых термическое равновесие устанавливается за период модуляции) и необратимым (у которых равновесие не может либо не успевает установиться) процессам, оценивать тепловые потери и вычислять кинетические и термодинамические параметры исследуемого процесса в одном эксперименте.

3.2.2. Анфолдинг лизоцима в глицерине по данным ТМДСК со ступенчатым нагревом

В отличие от обычного метода ДСК, где скорость нагрева либо охлаждения постоянна во время калориметрического эксперимента, в методе термомодулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (ТМДСК) скорость сканирования переменна во времени и обычно меняется по периодическому закону. Режим ТМДСК со ступенчатым нагревом

заключается в чередовании динамических сегментов (быстрый нагрев образца на температуру ΔT) и изотермических сегментов. Шаг температуры ΔT обычно выбирается небольшим, продолжительность изотермического сегмента должна существенно превышать длительность динамического. Анализ калориметрических кривых с термомодуляцией ведется путем расчета так называемой комплексной теплоемкости.

Величина комплексной теплоемкости (C^*), рассчитывается из отношения двух функций – теплового потока (ϕ) и скорости сканирования (β) от времени (τ) по уравнению [218,219]:

$$C^*(j\omega) = C'(j\omega) + iC''(j\omega) = \frac{\sum_{i=1}^n \phi_{\Sigma,i} \cos(j\omega\tau_i) + i \sum_{i=1}^n \phi_{\Sigma,i} \sin(j\omega\tau_i)}{\sum_{i=1}^n \beta_i \cos(j\omega\tau_i) + i \sum_{i=1}^n \beta_i \sin(j\omega\tau_i)}$$

здесь C' -действительная часть, C'' -мнимая часть комплексной теплоемкости, ω -частота модуляции, j -номер гармоники.

Действительная составляющая комплексной теплоемкости соответствует вкладу обратимых процессов в тепловой поток, в то время вклад необратимых процессов равен разности между средней теплоемкостью и вкладом обратимых процессов. Необратимая составляющая теплового потока отражает вклад в суммарный тепловой эффект процессов, являющихся термодинамически необратимыми (т. е. ведущих к производству энтропии, например, перенос тепла от горячего тела к холодному), либо процессов, время релаксации которых значительно дольше периода модуляции. В литературе для описания обратимого и необратимого вкладов иногда используют термины *reversing* (реверсивный) и *non-reversing* (нереверсивный), чтобы отличать их от понятий, относящихся к обратимым (*reversible*) и необратимым (*irreversible*) процессам с точки зрения термодинамики.

Для математической обработки ступенчатых кривых теплового потока написана программа, которая производит расчет мнимой и действительной составляющих комплексной теплоемкости на разных гармониках основной частоты модуляции на каждой ступени в ходе эксперимента.

Анфолдинг лизоцима в глицерине исследовали с применением методики термомодуляции в режиме ступенчатого нагрева на сверхбыстром калориметре Mettler Toledo FlashDSC1 и FlashDSC2+ с использованием открытых чип сенсоров UFS1. Температурная программа ступенчатого сканирования включает нагрев со скоростью 100 К/с в динамическом сегменте с шагом температуры 1 К и длительностью изотермы 0,49 с, таким образом реализуется период модуляции 0,5 с и средняя скорость нагрева 2 К/с. Изменение теплового потока, температуры и скорости сканирования в течение одного периода приведены на Рисунке 37. Из рисунка видно, что время отклика сенсора с образцом составляет примерно 0,2 с (время, за которое тепловой поток приходит к стационарному значению).

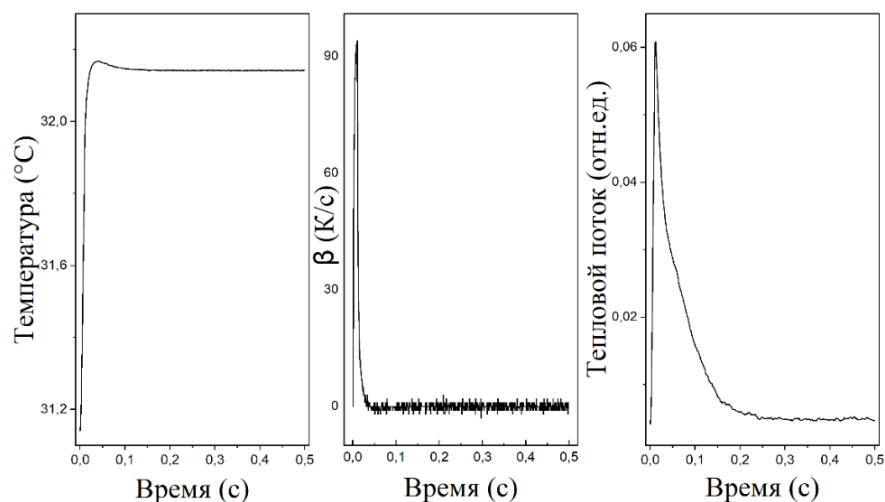


Рисунок 37 – Изменение температуры, скорости нагрева и величины теплового потока в ходе одного периода термомодуляции на сверхбыстром калориметре при съемке на открытом чип-калориметре в режиме ступенчатого сканирования. Образец – раствор лизоцима в глицерине.

На Рисунке 38 показано сравнение сигнала $C'(0)$ (средняя теплоемкость) ступенчатого нагрева и нормализованного теплового потока, полученного при непрерывном нагреве с той же средней скоростью (2 К/с), которая была реализована во время ступенчатого сканирования. Как видно из Рисунка 38 пик около 97°C едва заметен на кривых, это объясняется следующим. Регистрируемый неадиабатическим сканирующим калориметром тепловой

поток можно представить в виде двух вкладов – первый связан с теплоемкостью образца ($\phi(C_p\beta, T)$) и протекающими в образце процессами, величина этого вклада пропорциональна скорости сканирования, второй обусловлен обменом тепла между измерительной ячейкой и окружающей средой и представляет собой тепловые потери ($\phi_{loss}(T)$):

$$\phi_{\Sigma} = \phi(C_p, \beta, T) + \phi_{loss}(T)$$

При малых скоростях сканирования величина первого вклада уменьшается, поэтому форму калориметрической кривой в значительной степени начинает определять второй вклад.

Использование ступенчатого нагрева позволяет оценить величину тепловых потерь. Стационарный тепловой поток на изотермических сегментах соответствует $\phi_{loss}(T)$ и позволяет найти функцию $\phi_{loss} = f(T)$. Зная которую, можно рассчитать $\phi(C_p, \beta, T) = \phi_{\Sigma} - \phi_{loss}(T)$.

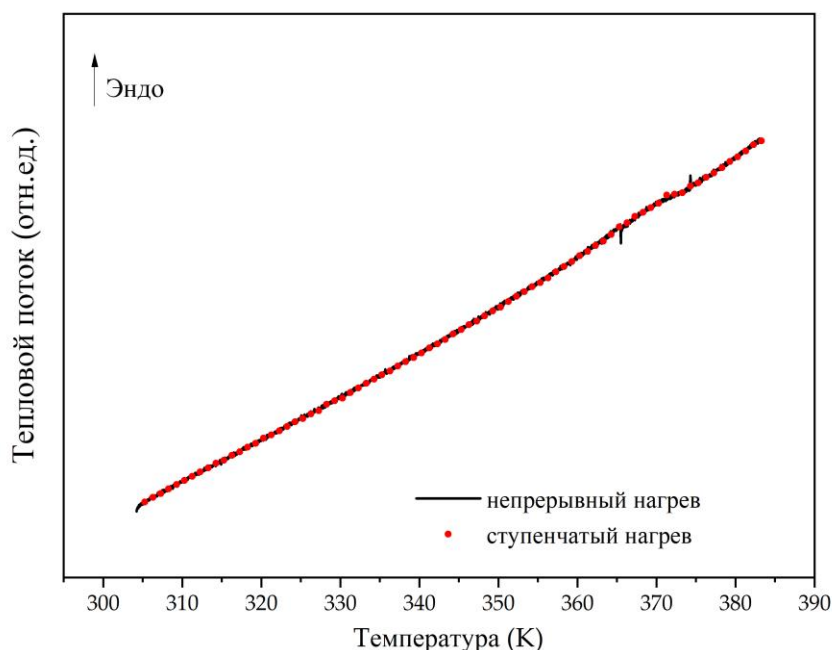


Рисунок 38 – Сопоставление кривых нагрева лизоцима в глицерине из двух экспериментов на открытом чип-калориметре: непрерывное сканирование (черным цветом) и результат обработки ступенчатого нагрева в виде сигнала $C'(0)$ (красным цветом). Концентрация лизоцима 50 мг/мл, в ячейке сравнения – глицерин, в ячейке с образцом – лизоцим в глицерине. Период модуляции при ступенчатом сканировании 0,5 с, изотермический сегмент – 0,49 с, скорость на нагревах 100 К/с. Скорость при непрерывном нагреве – 2 К/с.

После поправки кривой ступенчатого нагрева на тепловые потери на зависимости величины $C'(0)$ от температуры обнаруживает эндотермический эффект анфолдинга белка, Рисунок 39 слева.

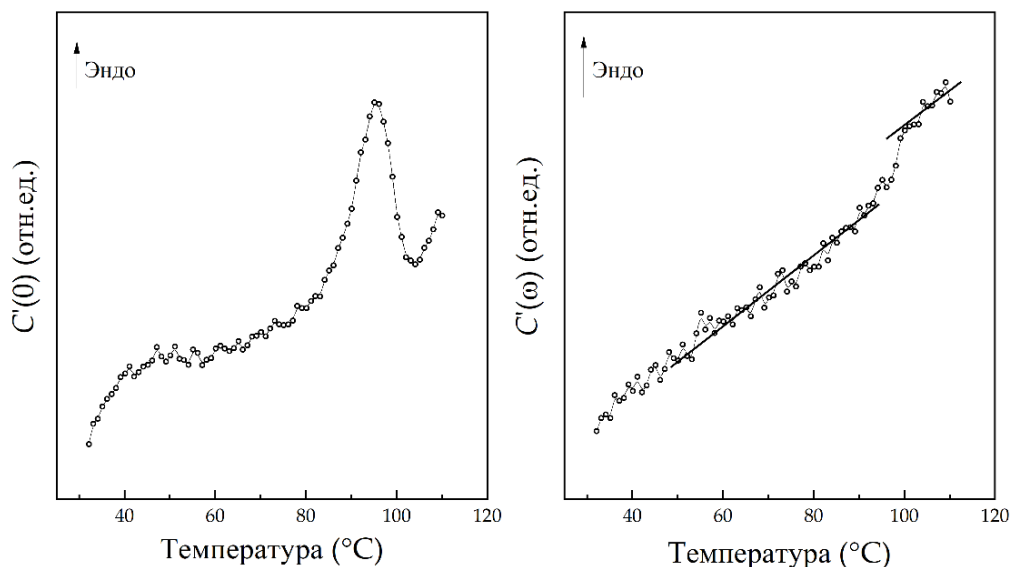


Рисунок 39 – Слева: средняя теплоемкость $C'(0)$ образца лизоцима в глицерине, зависимость получена путем обработки калориметрической кривой ступенчатого нагрева (рисунок 38) с коррекцией на тепловые потери; справа: действительная составляющая комплексной теплоемкости $C'(\omega)$ (обратимый вклад в тепловой эффект) из того же эксперимента, линии добавлены для выделения изменения теплоемкости. Концентрация лизоцима 50 мг/мл, в ячейке сравнения – глицерин, в ячейке с образцом – лизоцим в глицерине. Период модуляции при ступенчатом сканировании 0,5 с, изотермический сегмент – 0,49 с, скорость на нагревах 100 К/с.

Периоды шагов, реализуемые с помощью прибора FlashDSC1 на открытом сенсоре UFS1 слишком коротки для реализации квазиравновесного режима анфолдинга лизоцима в глицерине (при более длительных изотермах ухудшается отношение сигнал/шум и уже заметно испарение глицерина), поэтому действительная часть комплексной теплоемкости, соответствующая обратимому вкладу, не содержит пика, однако, становится различим скачок теплоемкости при анфолдинге белка, Рисунок 39 (справа).

3.2.3. Анфолдинг лизоцима в воде по данным ТМДСК со ступенчатым нагревом

Поскольку вода является основой естественного окружения белка, изучение процессов анфолдинга/фолдинга представляет главный интерес в водных растворах. Разработка жидкостных чип-сенсоров позволяет проводить калориметрические измерения водных растворов белка, избегая испарения. Ячейки и датчик закрыты пластиковой крышкой, в которой имеются отверстия для ввода и вывода жидкости. Общий объем жидкости в ячейке – 1 мкл, в то время как непосредственно над нагревателем находится около 10 нл образца. Остальная жидкость заполняет отверстия и имеет температуру окружающей среды, тем самым предотвращает влияние испарения на регистрируемый тепловой эффект [137]. Однако по сравнению с открытыми калориметрическими сенсорами (UFS1 и подобные) скорость сканирования жидкостных сенсоров ограничена.

Высокая скорость сворачивания лизоцима в водных растворах [216] не позволяет провести исследование изотермического фолдинга лизоцима в воде с помощью жидкостного сенсора. Вместе с тем время установления равновесия между нативной и денатурированной формами лизоцима в воде должно быть достаточно малым, поэтому можно ожидать реализации квазиравновесного режима сканирования в ходе ступенчатого нагрева. Для проверки этого предположения были получены калориметрические кривые ТМДСК со ступенчатым нагревом раствора лизоцима в воде. Периоды модуляции варьировались от 1 с до 15 с, шаг сканирования сохранялся – 1°C.

Изменение теплового потока в ходе ступенчатого нагрева в закрытом калориметрическом сенсоре с периодом модуляции 8 с приведено на Рисунке 40.

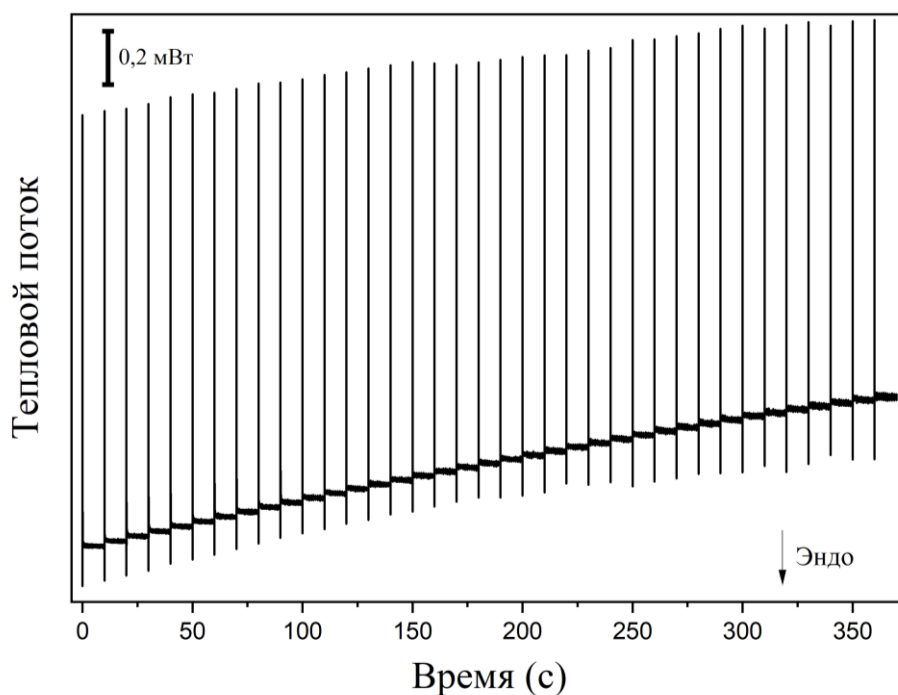


Рисунок 40 – Изменение теплового потока в ходе ступенчатого нагрева водного раствора лизоцима на жидкостном сверхбыстром чип-калориметре. Концентрация белка – 100 мг/мл. Период модуляции – 8 с, изотермический сегмент – 7,99 с, скорость на нагревах – 100 К/с.

Температурные зависимости действительной и мнимой составляющих комплексной теплоемкости представленной калориметрической кривой приведены на Рисунке 41. В эксперименте с периодом модуляции 8 с на зависимости действительной составляющей комплексной теплоемкости (обратимый вклад) обнаруживается тепловой эффект, а на зависимости мнимой составляющей эффект отсутствует, следовательно, процесс анфолдинга протекает в квазиравновесном режиме. Для такого процесса величина действительного вклада в комплексную теплоемкость отражает обратимый тепловой эффект и позволяет рассчитывать термодинамические параметры равновесия анфолдинг/фолдинг, например, по методу Вант-Гоффа. В то же время ступенчатая калориметрическая кривая потенциально содержит информацию о кинетике процесса анфолдинга.

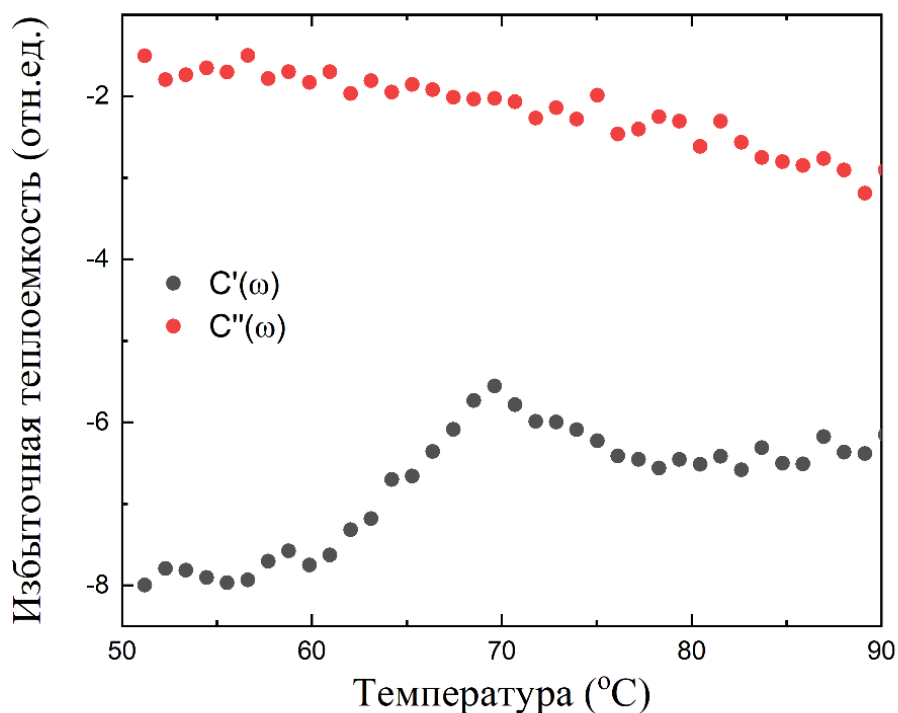


Рисунок 41 – Температурные зависимости действительной и мнимой составляющих комплексной теплоемкости, полученные в результате обработки калориметрической кривой теплового потока на Рисунке 40.

Таким образом, в зависимости от параметров ступенчатого нагрева, может реализовываться как квазиравновесный, так и кинетически необратимый режим нагрева. Необходимо установить условия, в которых реализуется тот либо другой режим нагрева. Для этого было проведено математическое моделирование кривых ТМДСК со ступенчатым нагревом.

3.3 Математическое моделирование калориметрических кривых ТМДСК со ступенчатым нагревом

Рассмотрим обратимый анфолдинг белка в рамках модели двух состояний. Согласно этой модели, при любой температуре белок существует только в нативном (N) или развернутом (D) состоянии. Константа равновесия между конформациями белка определяется уравнением:

$$K = \frac{D}{N} = e^{-(\Delta H - T\Delta S)/RT} \quad (18)$$

где ΔH и ΔS - разность энтальпии и энтропии между развернутым и нативным состояниями. Эти функции сами зависят от температуры, и, считая, что разность теплоемкости между формами белка (Δc_p) не зависит от температуры, их можно записать как:

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_{ref}) + \Delta c_p(T_{ref} - T), \quad (19)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_{ref}) + \Delta c_p \ln \frac{T}{T_{ref}}, \quad (20)$$

здесь T_{ref} - некоторая референсная температура; T_m - «температура плавления белка», при которой концентрация двух форм одинакова. Если принять, $T_{ref} = T_m$, тогда изменение энтропии можно рассчитать из энтальпии процесса при температуре T_m :

$$\Delta_N^D S(T_{ref}) = \Delta_N^D S(T_m) = \frac{\Delta_N^D H(T_m)}{T_m} \quad (21)$$

Предположим, что процесс анфолдинга и обратный ему процесс фолдинга белка подчиняются кинетике первого порядка, тогда температурная зависимость константы скорости будет описываться уравнением Аррениуса. При температуре T_m константы скорости анфолдинга и фолдинга должны быть равны, что позволяет использовать альтернативную запись уравнения Аррениуса, для исключения предэкспоненциального множителя в уравнении кинетической константы:

$$k_{N \rightarrow D} = k_0 \exp\left(-\frac{E_{a,N \rightarrow D}(T - T_m)}{RTT_m}\right) \quad (22)$$

$$k_{D \rightarrow N} = k_0 \exp\left(-\frac{E_{a,D \rightarrow N}(T - T_m)}{RTT_m}\right), \quad (23)$$

$$E_{a,N \rightarrow D} - E_{a,D \rightarrow N} = \Delta H(T_m) \quad (24)$$

где $E_{a,N \rightarrow D}$ и $E_{a,D \rightarrow N}$ - энергии активации анфолдинга и фолдинга; k_0 - константа скорости при T_m , когда скорости анфолдинга и фолдинга равны.

Если систему вывести из состояния равновесия, она будет возвращаться к равновесию, следуя обратимой кинетике первого порядка:

$$\frac{dD}{d\tau} = -\frac{dN}{d\tau} = k_{N \rightarrow D}(1 - D) - k_{D \rightarrow N}D \quad (25)$$

При постоянной температуре вышеприведенное уравнение интегрируется и дает:

$$D(\tau) = D_0 + (D_{eq} - D_0)(1 - \exp(-(k_{N \rightarrow D} + k_{D \rightarrow N})\tau)) \quad (26)$$

где D_{eq} - равновесная концентрация развернутых молекул белка, D_0 - начальная концентрация (при $\tau=0$).

Сигнал теплового потока, регистрируемый в ходе нагрева на ДСК кривой белка, может быть разделен на три основных вклада: $\phi_{\Sigma} = \phi_c + \phi_{loss} + \phi_D$. Первый вклад представляет собой тепловой поток, необходимый для изменения температуры системы и связанный с ее теплоемкостью $\phi_c = \Delta C_p \beta$, где ΔC_p - разность абсолютных теплоемкостей ячейки образца и эталона. Второй - это потери тепла (ϕ_{loss}), возникающие из-за асимметрии измерительных ячеек, этот вклад пропорционален разности температур между калориметрическими ячейками и окружающей средой $\phi_{loss} \propto T - T_{окр.ср.}$. И, наконец, третий вклад - это тепловой поток, обусловленный процессом анфолдинга $\phi_D = \frac{dH}{d\tau} = \frac{1}{\beta} \frac{dH}{dT} = \frac{\Delta H(T)}{\beta} \frac{dD}{dT}$. Здесь функция $\Delta H(T)$ уже включает в себя член, связанный с разницей теплоемкостей между нативной и развернутой конформациями, поэтому отдельно этот вклад учитывать не нужно.

Если реализуется идеальный ступенчатый нагрев (изменение температуры между ступенями происходит бесконечно быстро, и, следовательно, процесс анфолдинга протекает только на изотерме), можно оценить концентрацию D как функцию времени, используя уравнение (26). Это позволяет вычислить энтальпию системы (считая энтальпию нативного состояния равной нулю) по уравнению:

$$H(\tau) = \Delta H(T)D(\tau, T) \quad (27)$$

и затем рассчитать тепловой поток, обусловленный анфолдингом в момент времени τ , по дифференциальному уравнению:

$$\phi_D(\tau) = \frac{dH(\tau)}{d\tau} \quad (28)$$

В случае если нагрев осуществляется с конечной скоростью, необходимо учитывать протекание процесса анфолдинга в ходе нагрева. Для этого дифференциальное уравнение (25) можно интегрировать численно, учитывая температурную зависимость кинетических констант. Однако при дискретном расчете калориметрической кривой, если расчет ведется при относительно малой величине интервала времени между отсчетами $\Delta\tau$ (то есть изменение температуры между отсчетами ($\Delta T = \beta\Delta\tau$) мало), ход процесса анфолдинга за один интервал между отсчетами может быть оценен при постоянных значениях кинетических констант. Таким образом, уравнение (26) может быть использовано для каждого шага дискретизации, а уравнение (28) решено в дискретной форме:

$$\phi_D(\tau_i) = \frac{H(\tau_i) - H(\tau_{i-1})}{\Delta\tau}, \quad (29)$$

где $\phi_D(\tau_i)$ – вклад теплового эффекта анфолдинга в суммарный тепловой поток в момент времени τ_i , $H(\tau_i)$ и $H(\tau_{i-1})$ энтальпия белка в моменты времени τ_i и τ_{i-1} , соответственно, $\Delta\tau = \tau_i - \tau_{i-1}$ интервал времени между отсчетами.

Таким образом, чтобы смоделировать калориметрическую кривую в эксперименте со ступенчатым сканированием, для начала нужно задать температурно-временной профиль, затем рассчитать $D(\tau, T)$ и, наконец, рассчитать тепловой поток. Идеальная ступенчатая кривая (с мгновенным нагревом между изотермами) была отфильтрована с помощью низкочастотного фильтра 2-го порядка с бесконечной импульсной характеристикой для моделирования температурного профиля, который может реализовать прибор ДСК.

Термодинамические и кинетические параметры анфолдинга были выбраны произвольно для описания небольшого белка в соответствии с моделью с двух состояний: $\Delta H(T_m) = 450$ кДж/моль, $T_m = 323,15$ К, $\Delta_N^D C_p = 6$ кДж/моль·К, $E_{a,N \rightarrow D} = 550$ кДж/моль. Большое значение энергии активации

использовалось для того, чтобы избежать отрицательной энергии активации процесса фолдинга, аналогичные значения параметров были использованы в литературе [220] для моделирования анфолдинга белка в ходе нагрева с разной скоростью. Для расчета общего теплового потока разность абсолютных теплоемкостей между измерительной ячейкой и ячейкой сравнения была выбрана такой, что $\phi_C = 4 * \phi_D$, когда белок полностью развернут.

На Рисунке 42 показаны рассчитанные кривые изменения температуры, скорости нагрева и теплового потока на одной ступени при температуре, далекой от T_m , так что заметного изменения состояния белка не происходит. В отсутствие явлений, связанных с теплопередачей, и при быстром отклике электроники кривая теплового потока точно соответствует кривой скорости нагрева.

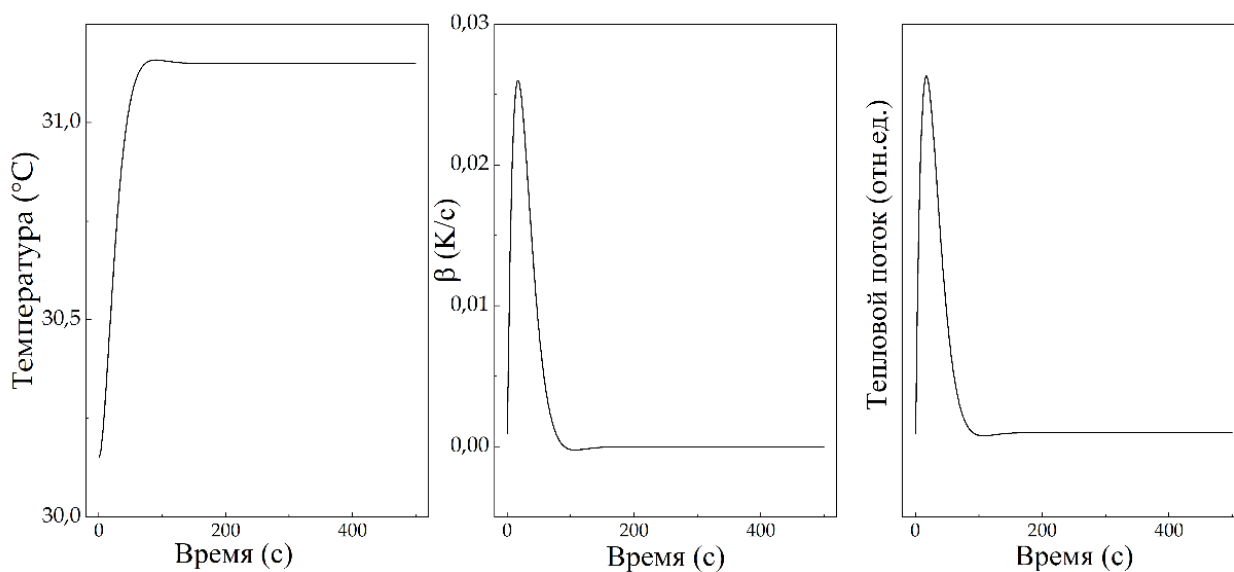


Рисунок 42 – Теоретическое изменение температуры, скорости сканирования и теплового потока во времени в ходе одного периода в режиме ступенчатой термомодуляции при температуре, далекой от T_m .

На Рисунке 43 можно увидеть, как стабилизируется величина теплового потока в ходе одного модулируемого периода для процессов с константой скорости от 10^{-1} до 10^{-4} с $^{-1}$. Показаны кривые теплового потока на температурной ступени между 50 и 51°C (вблизи T_m). Видно, что при уменьшении константы скорости анфолдинга величина пика на динамическом

сегменте уменьшается, в то время как на изотермическом сегменте становится заметен «хвост» тепловыделения, что обусловлено медленным установлением равновесия в системе.

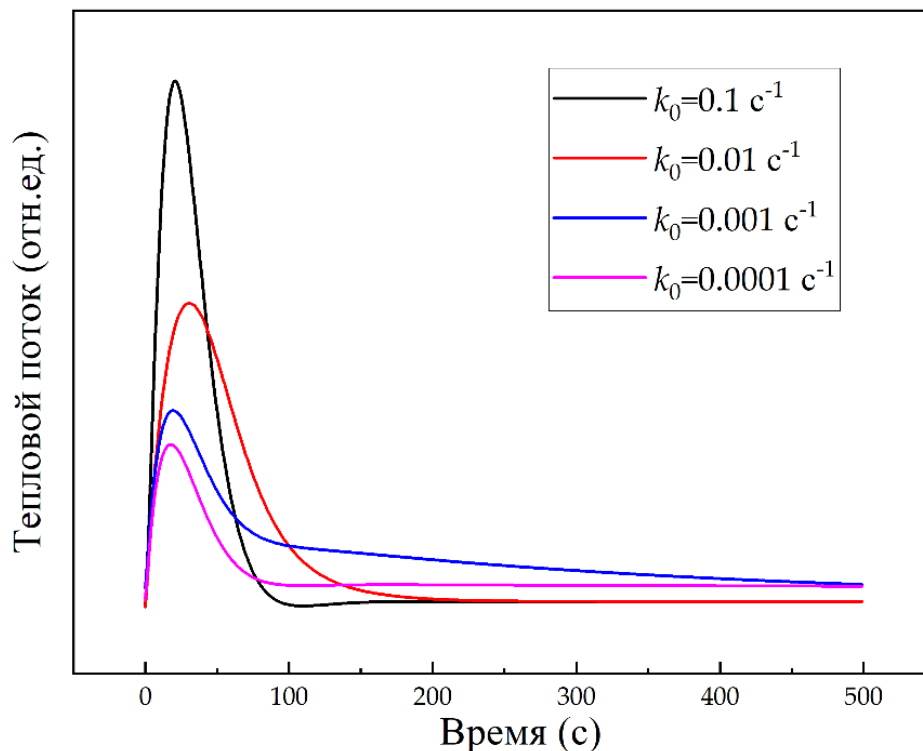


Рисунок 43 – Теоретически рассчитанное изменение величины теплового потока в ходе одного периода ступенчатой термомодуляции при температуре около T_m для нескольких констант скорости анфолдинга.

Сравнение калориметрически кривых со ступенчатым нагревом для процесса анфолдинга с разной константой скорости приведено на Рисунке 44. Видно, что с уменьшением скорости анфолдинга линия, огибающая эффекты на динамических сегментах, смещается в область высоких температур, кроме того становится выраженной «кривизна» изотермических сегментов.

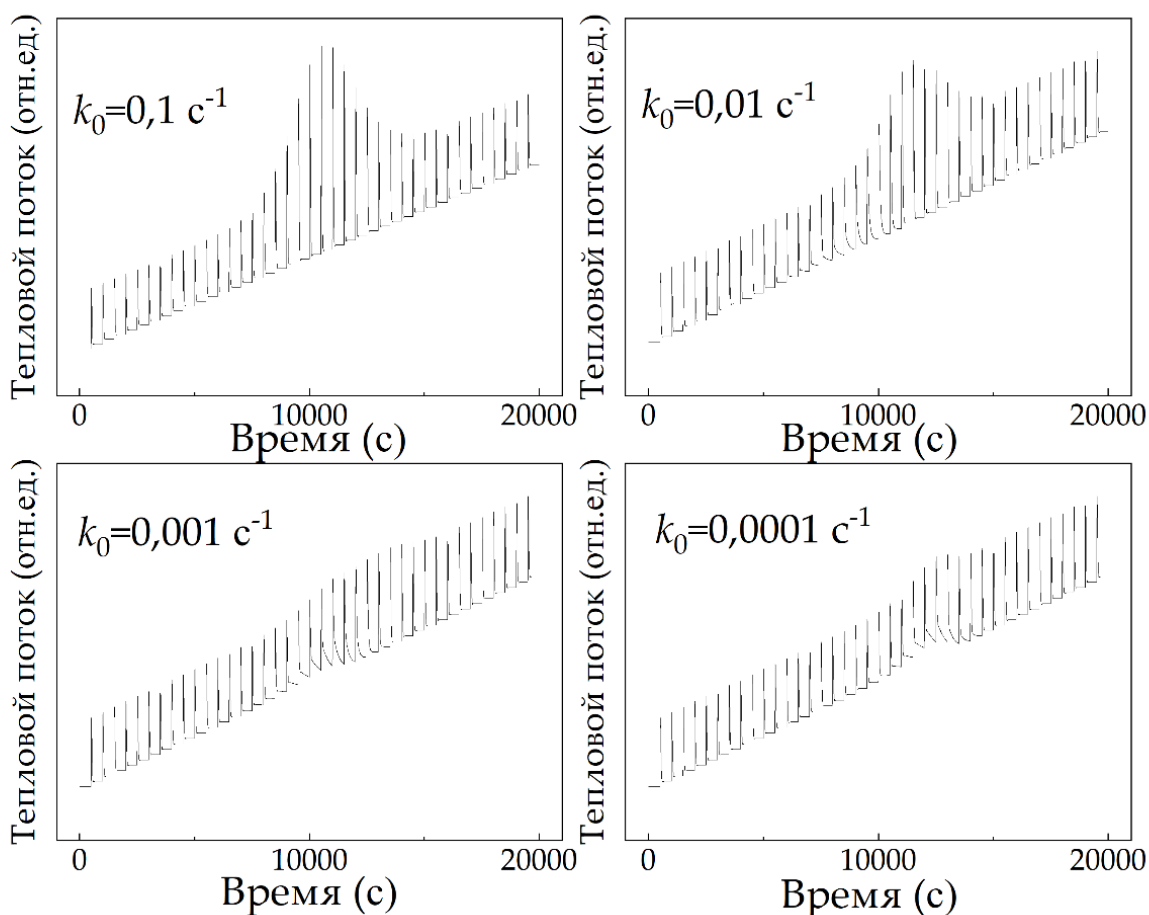


Рисунок 44 – Теоретические калориметрические кривые ступенчатого нагрева белка при обратимом анфолдинге с константой скорости от 10^{-4} до 10^{-1} (c^{-1}), длительность одной ступени модуляции (нагрев и изотерма) 500 с.

На Рисунке 45 показаны температурные зависимости действительной и мнимой составляющих комплексной теплоемкости, а также необратимой составляющей теплового потока. Положение пика сигналов $C'(\omega)$, $C''(\omega)$ и $(C'(0) - C''(1))$ смещается к более высокой температуре с уменьшением константы анфолдинга, при этом величина вклада обратимого эффекта уменьшается, а необратимого – растет. При достаточно низкой константе скорости, когда время релаксации $\left(1/(k_{N \rightarrow D} + k_{D \rightarrow N})\right)$ намного больше периода модуляции, пик действительной части комплексной теплоемкости (обратимый вклад в тепловой эффект) фактически исчезает. Для описываемой модели анфолдинга температура пика мнимой составляющей теплоемкости ниже, чем температура пика действительной части. Это связано с тем, что

кинетические константы увеличиваются с температурой, поэтому время, необходимое системе для установления равновесия, соответственно уменьшается.

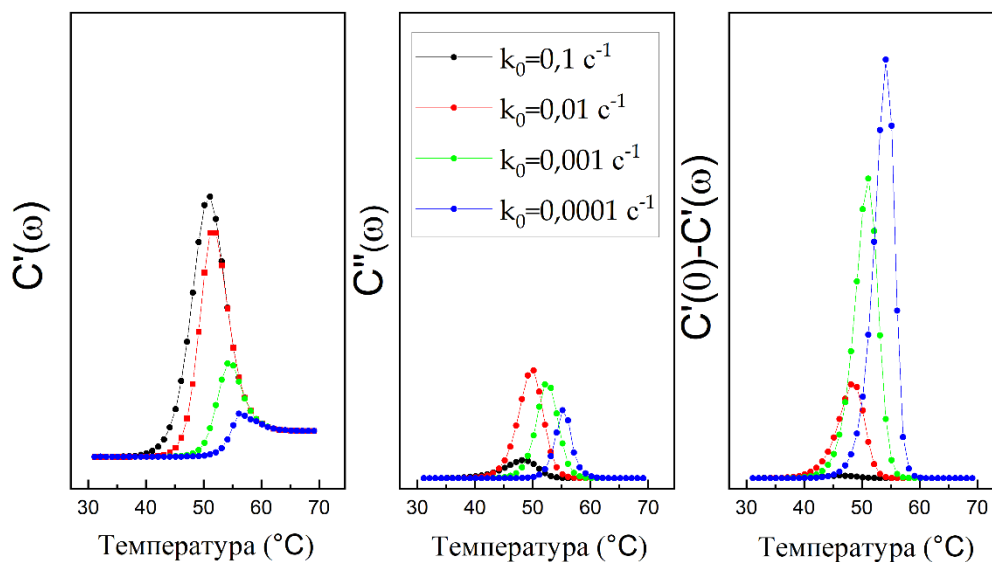


Рисунок 45 – Температурные зависимости $C'(\omega)$ (обратимая составляющая теплового эффекта), $C''(j\omega)$ (мнимая составляющая комплексной теплоемкости) и $(C'(0) - C''(1))$ (необратимая составляющая теплового эффекта) при различных скоростях анфолдинга. Параметры процесса, выбранные при моделировании $\Delta H(T_m) = 450 \text{ кДж/моль}$, $T_m = 323,15 \text{ К}$, $\Delta_N^D C_p = 6 \text{ кДж/моль}\cdot\text{К}$, $E_{a,N \rightarrow D} = 550 \text{ кДж/моль}$.

Квазиравновесный режим сканирования, признаком которого является отсутствие необратимого вклада в суммарный тепловой эффект, а также значительно меньшая величина калориметрического пика на мнимой составляющей комплексной теплоемкости по сравнению с калориметрическим пиком на действительной составляющей (обратимый вклад в тепловой поток), реализуется, когда величина произведения кинетической константы на период модуляции $k_0 \cdot \tau \gtrsim 50$.

Таким образом, математическое моделирование позволяет заметить связь между температурными зависимостями составляющих комплексной теплоемкости, рассчитываемыми из калориметрической кривой ступенчатого нагрева, и кинетическими параметрами процесса анфолдинга, а также

показать критерии реализации кинетически необратимого или квазиравновесного режима анфолдинга.

Полученные результаты по практическому применению термомодулированной сканирующей калориметрии со ступенчатым нагревом для исследования процесса анфолдинга лизоцима, а также моделированию калориметрических кривых ступенчатого нагрева белка представлены в работе [221].

3.4 Сопоставление возможностей классического ДСК и сверхбыстрых калориметров в области исследования анфолдинга и фолдинга белков

ДСК является одним из классических инструментов для изучения термостабильности белков (см. раздел 1.2.2), который имеет особое значение благодаря возможности прямого измерения тепловых эффектов процессов анфолдинга и фолдинга. Настоящая работа демонстрирует возможности сверхбыстрой калориметрии – современного развития классической ДСК – в области изучения процессов анфолдинга и фолдинга белка. Показана перспектива использования термомодулированной ДСК со ступенчатым нагревом на чип-калориметрах, но необходимо отметить, что эта методика получила крайне ограниченное применение и на базе классического ДСК. Поэтому мы провели измерения калориметрических кривых ступенчатого нагрева растворов лизоцима с использованием классического ДСК.

3.4.1 ТМДСК со ступенчатым нагревом на классическом ДСК

Для сравнения характеристик сверхбыстрых и традиционных калориметров методика ступенчатой термомодуляции реализована на капиллярном калориметре NanoDSC (TA Instruments); получены кривые ступенчатого нагрева лизоцима в воде и смесях вода-ДМСО, вода-третбутанол.

На Рисунке 46 можно увидеть зависимости температуры, скорости нагрева и величины теплового потока от времени в ходе одного

температурного шага (нагрев на 1°C со скоростью $0,5\text{ K/мин}$ и изотерма) длительностью 1080 с , измеренные в водном растворе лизоцима с содержанием белка 10 мг/мл . Сложная форма кривых скорости нагрева и теплового потока обусловлена алгоритмом работы системы компенсации мощности калориметра NanoDSC. В ходе экспериментов было обнаружено, что максимальная скорость нагрева, реализуемая на динамическом сегменте, составляет $0,5\text{ K/мин}$, хотя в режиме нагрева с постоянной скоростью максимальная скорость нагрева 2 K/мин . При попытке реализации ступенчатого нагрева с большей скоростью на динамическом сегменте программное обеспечение прерывает регистрацию данных. Время, за которое тепловой поток приходит к стационарному значению на изотермическом сегменте, составляет порядка 400 с .

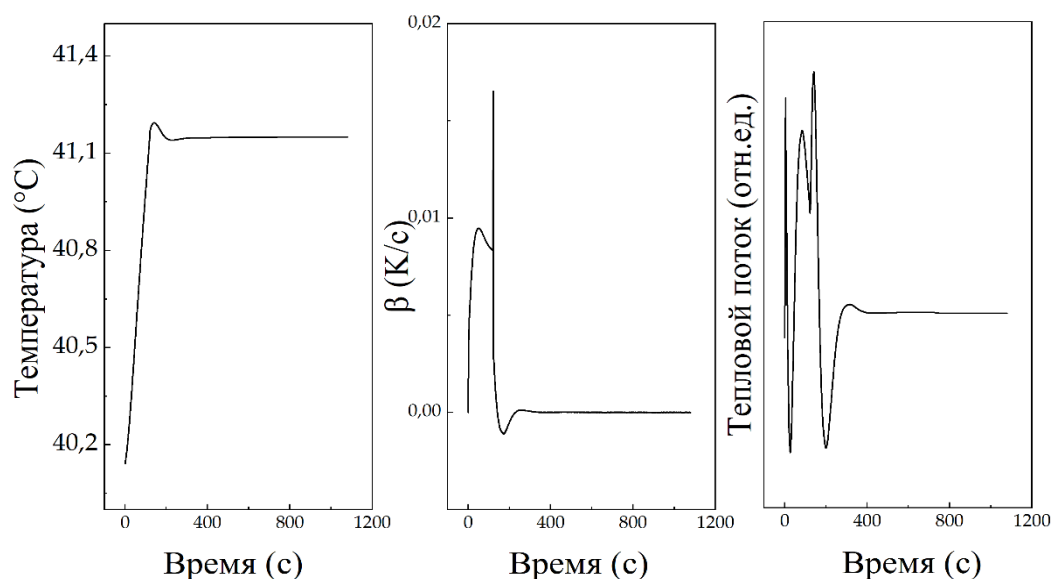


Рисунок 46 – Изменение температуры, скорости нагрева (β) и величины теплового потока в ходе одного периода термомодуляции, записанные при реализации ступенчатого нагрева водного раствора лизоцима на калориметре NanoDSC (TA Instruments). Концентрация белка 10 мг/мл . Изотермический сегмент – 16 мин , скорость нагрева на динамическом сегменте – $0,5\text{ K/мин}$.

Таким образом, с использованием калориметра NanoDSC можно реализовать программу ступенчатого нагрева только с периодом как минимум

в 2-3 раза превышающим время стабилизации теплового потока. Это означает, что для таких белков как лизоцим анфолдинг будет протекать в заведомо квазиравновесных условиях, а отклонения от равновесности будут означать протекание необратимых процессов (например, дезамидирование, агрегация) либо инструментальные эффекты (тепловые потери).

Полную кривую теплового потока, зарегистрированную в ходе ступенчатого нагрева образца лизоцима в воде, можно наблюдать на Рисунке 47. Период модуляции в эксперименте составляет 1080 с, шаг модуляции 1°C .

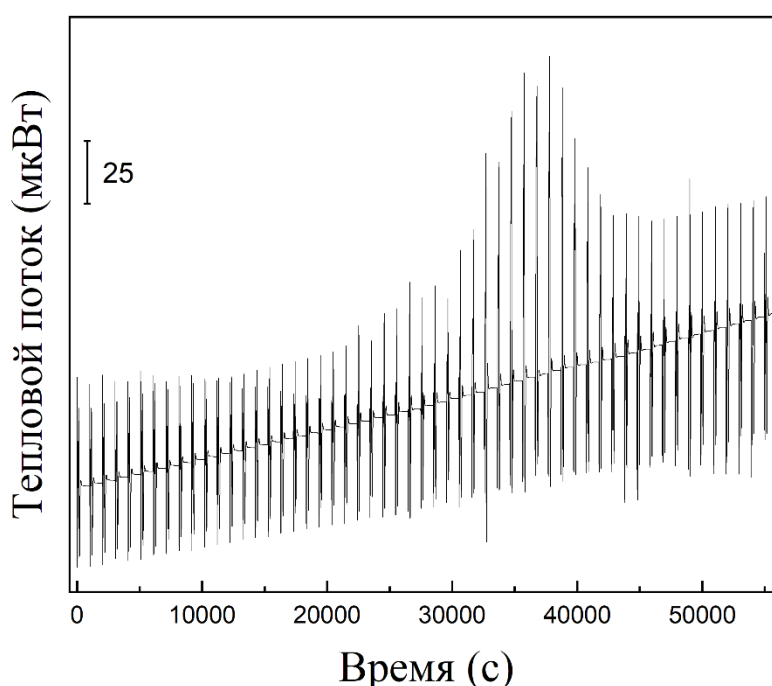


Рисунок 47 – Изменение теплового потока при ступенчатом нагреве водного раствора лизоцима. Концентрация белка 10 мг/мл. Изотермический сегмент – 16 мин, скорость нагрева на динамическом сегменте – 0,5 К/мин. Средняя скорость нагрева 0,056 К/мин.

Ниже представлены результаты математической обработки калориметрической кривой ступенчатого нагрева образца лизоцима в воде, реализованного на капиллярном калориметре. На зависимости средней теплоемкости $C'(0)$ от температуры заметен эффект анфолдинга белка (Рисунок 48). Видно, что базовая линия кривой имеет значительный наклон,

что обусловлено влиянием тепловых потерь, то есть обменом тепла между измерительными ячейками и термостатом.

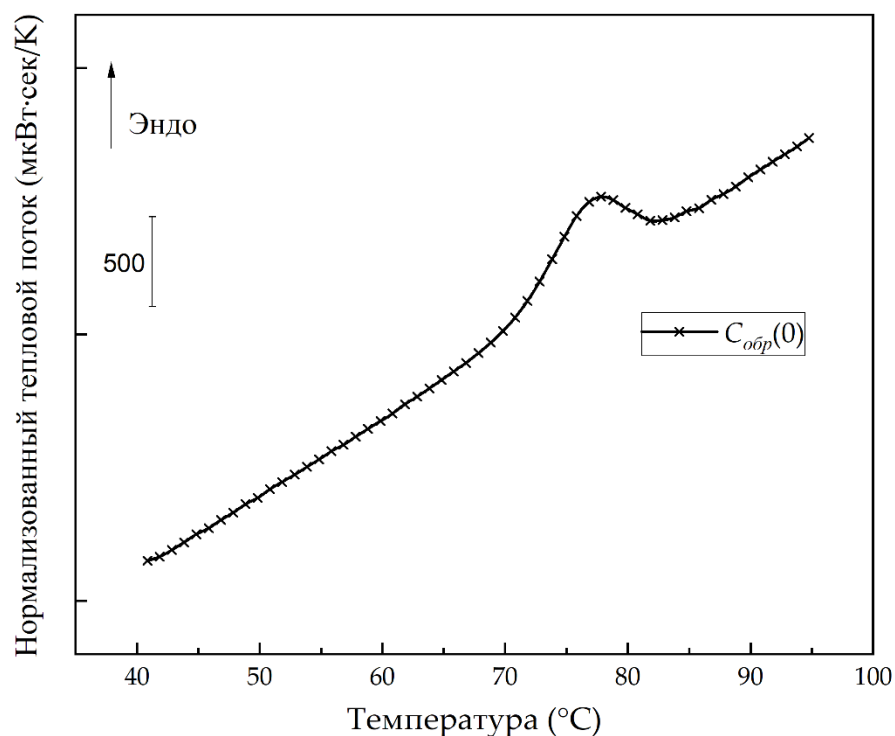


Рисунок 48 – Температурная зависимость средней теплоемкости $C'(0)$ раствора лизоцима в воде без поправки на потери для ступенчатого сканирования с шагом 1 К. Изотермический сегмент – 16 мин, скорость нагрева на динамическом сегменте – 0,5 К/мин. Средняя скорость нагрева 0,056 К/мин.

Для того же эксперимента рассчитаны температурные зависимости действительной $C'(\omega)$ и мнимой $C''(\omega)$ составляющих комплексной теплоемкости (Рисунок 49). На температурной зависимости действительной составляющей комплексной теплоемкости отчетливо виден эндотермический эффект анфолдинга. Эффект на температурной зависимости мнимой составляющей комплексной теплоемкости невелик, что говорит о квазиравновесном характере процесса. Температура пика на температурной зависимости $C'(\omega)$ (76 - 77°C) практически совпадает с температурой пика, экстраполированной на нулевую скорость нагрева (77,15°C) по данным работы [189].

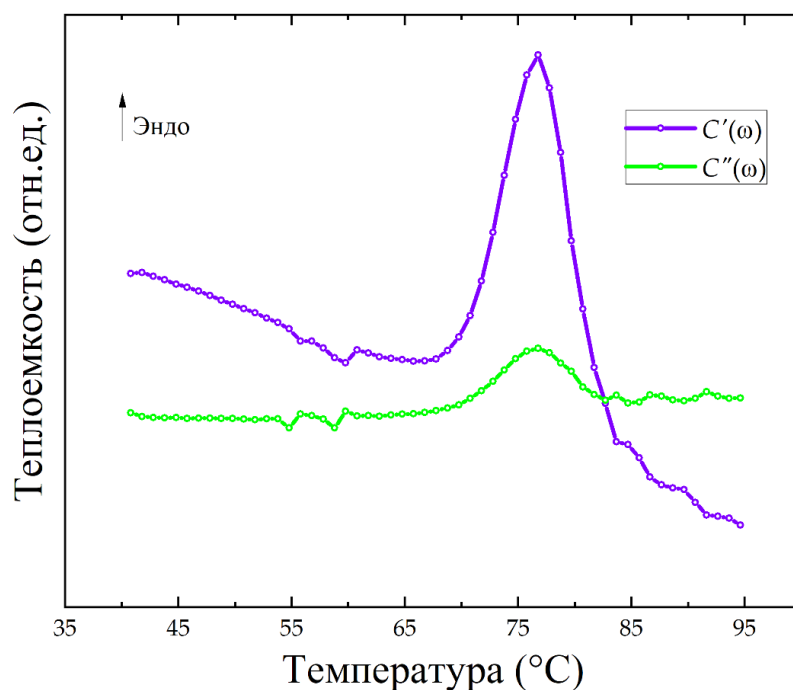


Рисунок 49 – Температурные зависимости величин $C'(\omega)$ и $C''(\omega)$ для анфолдинга лизоцима в воде при выполнении ступенчатого сканирования с шагом 1 К, периодом 16 мин и скоростью нагрева на динамическом сегменте 0,5 К/мин; средняя скорость нагрева 0,056 К/мин.

Учет температурной зависимости стационарного теплового потока (установившегося теплового потока на изотермических сегментах) позволяет осуществить поправку исходного сигнала на тепловые потери и, таким образом, устранить кривизну базовой линии, наблюдающуюся на Рисунке 48. Полученная после поправки на тепловые потери температурная зависимость средней теплоемкости $C'(0)$, а также температурная зависимость изотермического теплового потока вследствие тепловых потерь (вставка) представлены на Рисунке 50 (кривая голубого цвета). На рисунке также приведена температурная зависимость действительной составляющей комплексной теплоемкости $C'(\omega)$ (кривая фиолетового цвета); видно, что величины $C'(\omega)$ и $C'(0)$ близки, что свидетельствует о незначительном вкладе необратимых процессов.

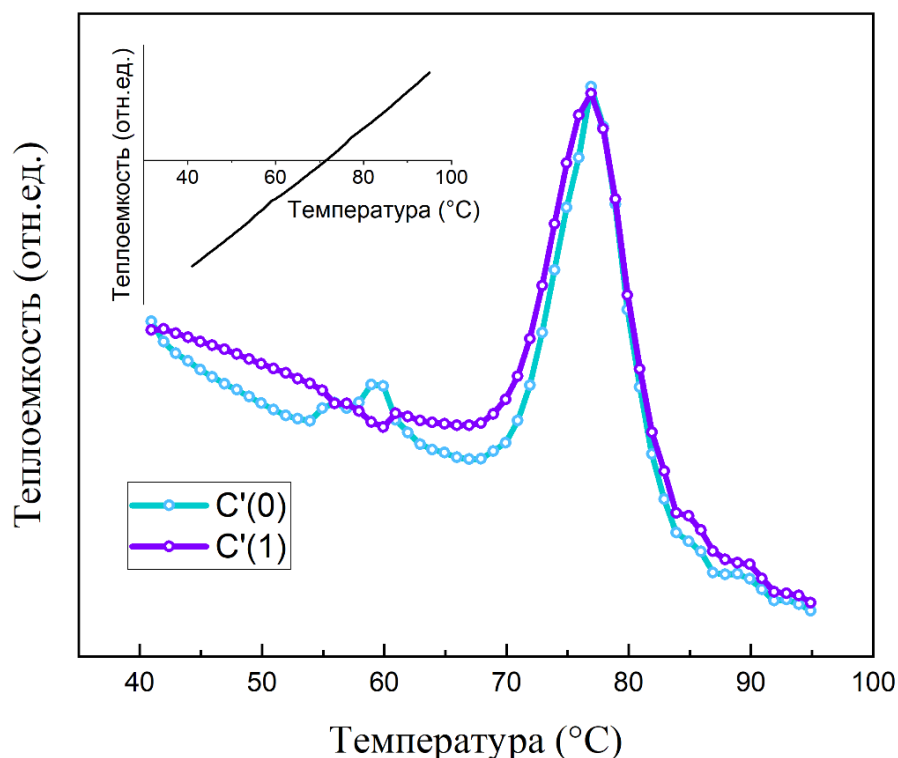


Рисунок 50 – Температурная зависимость средней теплоемкости $C'(0)$ с учетом корректировки на тепловые потери и действительной составляющей комплексной теплоемкости $C'(\omega)$ (обратимого вклада в тепловой эффект) в ходе анфолдинга лизоцима в воде при выполнении съемки в режиме ступенчатого нагрева. Вставка в левом верхнем углу показывает температурную зависимость стационарного теплового потока.

Ранее в литературе [156] был показан пример реализации ступенчатого нагрева раствора лизоцима на высокочувствительном адиабатическом ДСК. В таком калориметре тепловые потери минимизированы, соответственно, обработка результатов эксперимента упрощается. Описанный в настоящей работе подход, позволяющий устранить вклад от тепловых потерь, позволяет приблизить качество результатов, полученных на стандартном капиллярном ДСК, к адиабатическому ДСК.

Результаты обработки калориметрических измерений со ступенчатым нагревом растворов лизоцима в смеси третбуанола с водой ($\chi_{t-C_4H_9(OH)} = 0,15$) и ДМСО с водой ($\chi_{\text{ДМСО}} = 0,20$) приведены на Рисунках 51 и 52, соответственно, для сравнения также приведены калориметрические кривые

растворов лизоцима в смесях того же состава полученные в режиме непрерывного нагрева. Положение пика анфолдинга, полученное двумя методами для этих растворов лизоцима также практически совпадает. Вместе с тем, можно заметить, что сигнал действительной части комплексной теплоемкости (красные символы) позволяет более надежно установить положение и величину теплового эффекта анфолдинга, а также построить базовую линию.

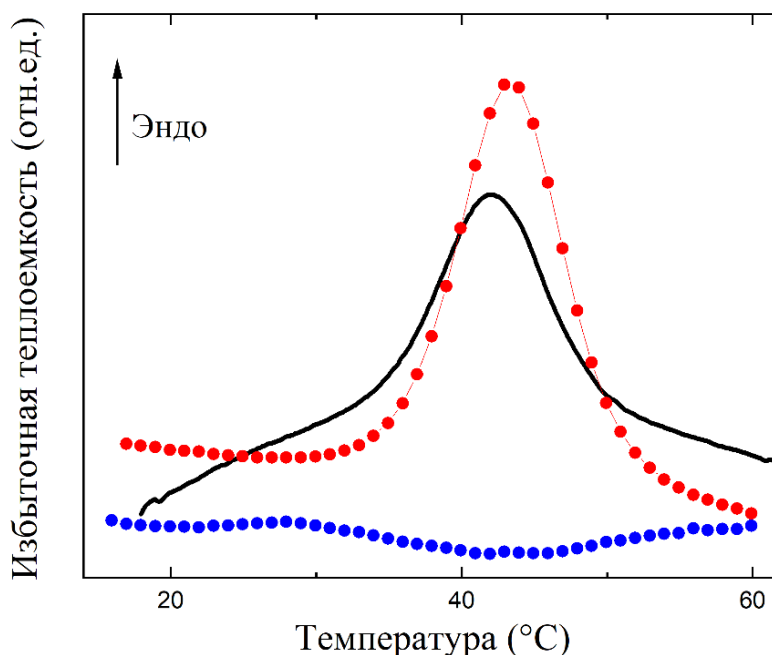


Рисунок 51 – Сравнение кривой ДСК непрерывного нагрева (черным цветом) и результата обработки ступенчатого сканирования для лизоцима в смеси вода-третбутанол $\chi_{t-c_4H_9(OH)} = 0,15$. $C'(\omega)$ – действительная составляющая комплексной теплоемкости (обратимый тепловой эффект, красным цветом), $C'(0) - C'(\omega)$ (синим цветом) – необратимый тепловой эффект. Съёмка кривых проведена на капиллярном калориметре NanoDSC, концентрация белка в растворе 10 мг/мл. Период модуляции в ходе ступенчатого сканирования составлял 1020 с, изотермический сегмент – 15 мин, скорость на нагревах 0,5 К/мин.

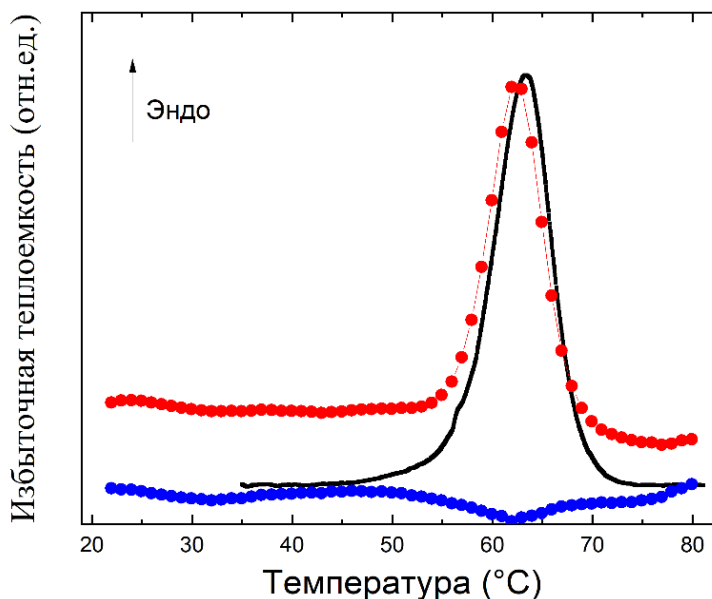


Рисунок 52 – Сравнение кривой ДСК непрерывного нагрева (черным цветом) и результата обработки ступенчатого сканирования для лизоцима в смеси вода-ДМСО $\chi_{\text{ДМСО}} = 0,20$. $C'(\omega)$ – действительная составляющая комплексной теплоемкости (обратимый тепловой эффект, красным цветом), $C'(0) - C'(\omega)$ (синим цветом) – необратимый тепловой эффект. Съемка кривых проведена на капиллярном калориметре NanoDSC, концентрация белка в растворе 10 мг/мл. Период модуляции в ходе ступенчатого сканирования составлял 1020 с, изотермический сегмент – 15 мин, скорость на нагревах 0,5 К/мин.

Таким образом, удалось продемонстрировать возможность улучшения разрешения калориметрических кривых на капиллярном калориметре при реализации ступенчатого сканирования по сравнению с простым (непрерывным) нагревом. Методика со ступенчатым нагревом может оказаться полезной при изучении обратимых процессов, например, холодной денатурации [222].

3.4.2 Факторы, определяющие время отклика и отношение сигнал-шум калориметрических чип-сенсоров

Как показывает выполненная работа, сверхбыстрые калориметры могут быть использованы для изучения кинетики изотермического фолдинга белков и оценки свойств неравновесного состояния белка, реализующегося в процессе фолдинга, что невозможно осуществить с помощью классических ДСК. В настоящей работе такие измерения были выполнены с помощью открытых калориметрических чипов, обеспечивающих высокие скорости нагрева и охлаждения (до 10^4 К/с). Необходимым условием для применения таких чипов является низкая летучесть образца, что было обеспечено путем использования глицерина в качестве растворителя. Таким образом, открытые калориметрические чипы могут быть использованы для исследования биомакромолекул, сохраняющих компактную структуру и демонстрирующих тепловой эффект анфолдинга при нагреве в глицерине, либо других нелетучих растворителях.

Значение соотношения сигнал-шум (SNR) можно оптимизировать, меняя размеры образца, нанесенного на сенсор, SNR может быть рассчитано следующим образом. Пусть содержание белка в образце составляет ω ($\%_{\text{масс}}$), масса образца m (г), а величина избыточной теплоемкости в максимуме пика анфолдинга составляет Δc_p (Дж/К·г), тогда, при заданных скорости нагрева β (К/с) и шуме прибора N (Вт), отношение сигнал/шум будет равно:

$$SNR = \frac{m \cdot \omega \cdot \Delta c_p \cdot \beta}{100 \cdot N} \quad (30)$$

Согласно данным производителя [202], сенсор UFS1 имеет шум 0,1 мкВт при скорости нагрева 100 К/с, 0,5 мкВт при скорости нагрева 1000 К/с. Величина Δc_p для лизоцима равна 4,2 Дж/К·г. Тогда, при массе образца 100 нг и содержании белка $5\%_{\text{масс}}$, отношение сигнал/шум равно 4,2. Нужно учитывать, что тепловой эффект анфолдинга имеет ширину порядка 20 К, в то время как шум сенсора имеет значительную высокочастотную составляющую, поэтому качество измеряемых кривых может быть улучшено путем

сглаживания. При сглаживании сигнала по десяти точкам отношение сигнал/шум увеличивается в $\sqrt{10} = 3,16$ раз.

Как видно из уравнения, с увеличением размера образца величина SNR пропорционально увеличивается, однако, одновременно растет время, за которое весь образец выходит на заданную температуру (время отклика). Нужно отметить, что температура образца измеряется в точке контакта мембраны и образца, поэтому показания прибора соответствуют температуре слоя образца, непосредственно контактирующего с мембраной. В образце же может существовать температурный градиент, который приводит к тому, что поглощение (либо выделение) тепла образцом происходит с задержкой.

На следующих Рисунках (53 и 54) представлены зависимости температуры, скорости нагрева и теплового потока двух образцов глицерина различной массы в ходе ступенчатого нагрева на один градус.

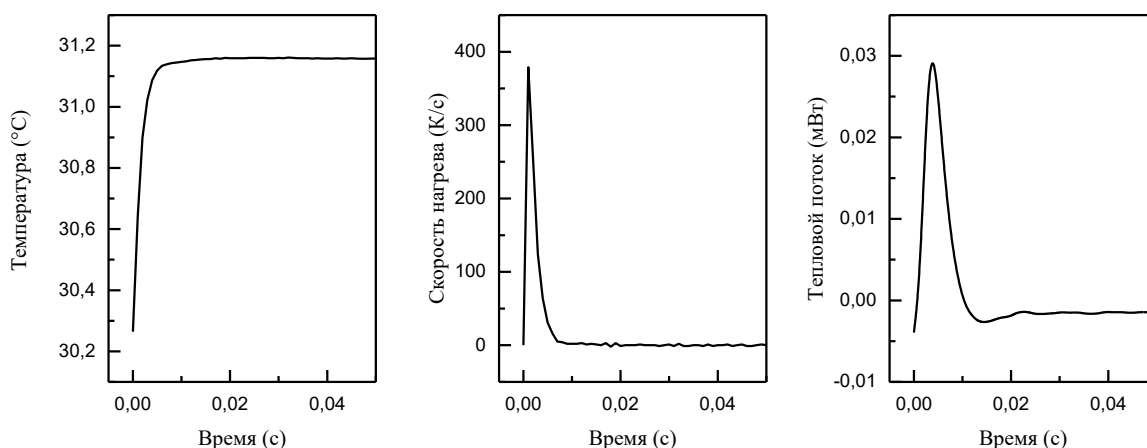


Рисунок 53 – Изменение температуры, скорости нагрева и величины теплового потока в ходе одного периода термомодуляции, записанные при реализации ступенчатого нагрева капли глицерина на сверхбыстром калориметре FlashDSC1 (Mettler-Toledo) с сенсором UFS1. Масса образца глицерина ~ 60 нг.

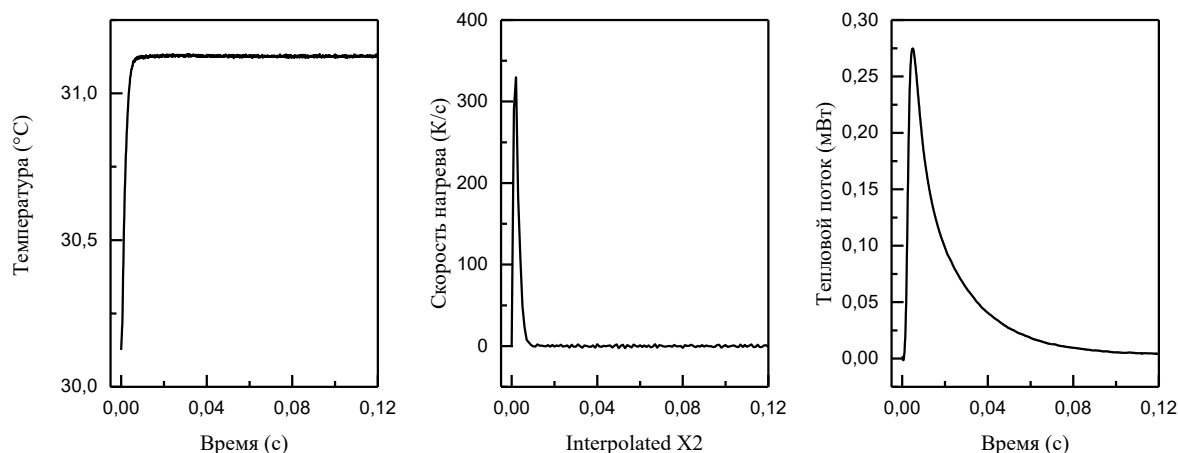


Рисунок 54 – Изменение температуры, скорости нагрева и величины теплового потока в ходе одного периода термомодуляции, записанные при реализации ступенчатого нагрева капли глицерина на сверхбыстром калориметре FlashDSC1 (Mettler-Toledo) с сенсором UFS1. Масса образца глицерина ~ 2,2 мкг.

Как видно из рисунков, если в случае образца массой 60 нг тепловой поток приходит к стационарному значению за ~ 0,02 с, то в случае образца массой 2,2 мкг тепловой поток стабилизируется за ~ 0,1 с. При этом максимальные скорости нагрева образцов, зафиксированные прибором, отличаются незначительно, однако необходимо помнить, что эта скорость отражает нагрев только слоя образца, непосредственно контактирующего с мембраной. Нужно подчеркнуть, что измеренные значения скорости нагрева на одном ступенчатом отрезке не отражают максимальных скоростей нагрева, которые можно достичь в режиме непрерывного нагрева. Это также является следствием задержки передачи тепла – в случае ступенчатого нагрева массе пропорционален интеграл кривой теплового потока, а не мгновенное значение, в отличие от режима непрерывного нагрева. Поэтому при использовании крупных образцов необходимо учитывать уширение пиков за счет задержки теплового потока.

Величина полуширины кривых теплового потока связаны с массой образца по следующей зависимости (Рисунок 55):

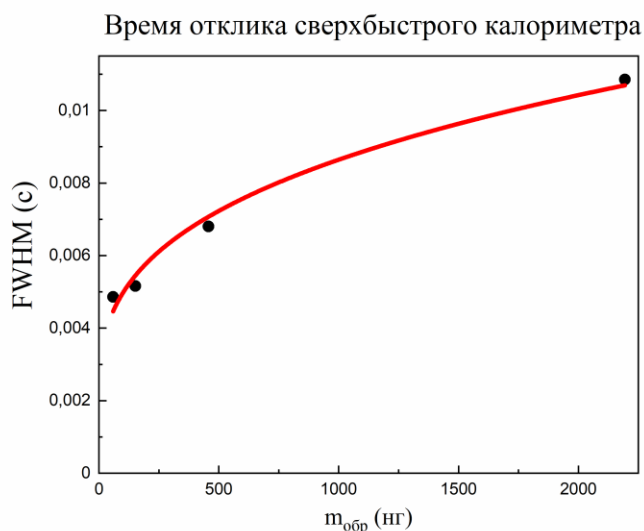


Рисунок 55 – Ширина пика теплового потока в ходе ступенчатого нагрева на один градус образцов глицерина с разной массой.

В грубом приближении можно считать, что ширина кривой теплового потока пропорциональна линейным размерам образца, поскольку разогрев происходит послойно от нижней части образца, которая непосредственно соприкасается с сенсором, до его внешней поверхности. При этом масса полусферического образца пропорциональна кубу его радиуса. Тогда время отклика будет пропорционально кубическому корню из массы образца (красная кривая на Рисунке 55).

Необходимо отметить, что при содержании лизоцима 5%_{масс} тепловой поток, связанный с эндотермическим эффектом анфолдинга составляет лишь ~ 8% от суммарного теплового потока, уходящего на нагрев образца. Таким образом, предложенный в настоящей работе подход, включающий размещение на референсном нагревателе чип-сенсора капли глицерина, оказывается очень полезен, поскольку в разностном сигнале, измеряемом чип-калориметром, сокращается вклад, относящийся к нагреву образца. Однако при использовании дополнительного образца на референсном сенсоре невозможно использовать методику определения массы по абсолютной теплоемкости образца [129,139]. Поэтому, при выполнении экспериментов, для которых необходимо определить массу образца, рекомендуется проведение измерений в несколько этапов: вначале на измерительный сенсор

нужно нанести образец раствора белка и определить его абсолютную теплоемкость, а уже затем на референсный сенсор можно нанести глицерин.

Жидкостные калориметрические чипы, пригодные для исследования водных растворов белка, имеют ограниченные скорости нагрева и охлаждения (~ 500 К/с). При этом время отклика чип-сенсора NanoLiq Xen-39400 (Xensor, Голландия) примерно соответствует времени отклика чипа UFS1 с крупным образцом. Соответствующие зависимости температуры, скорости нагрева и теплового потока от времени для чип-сенсора Xen-39400 приведены на следующем рисунке (Рисунок 56). Видно, что время стабилизации теплового потока составляет примерно 0,1 - 0,12 с, при этом максимальная скорость нагрева примерно в два раза ниже, чем у сенсора UFS1.

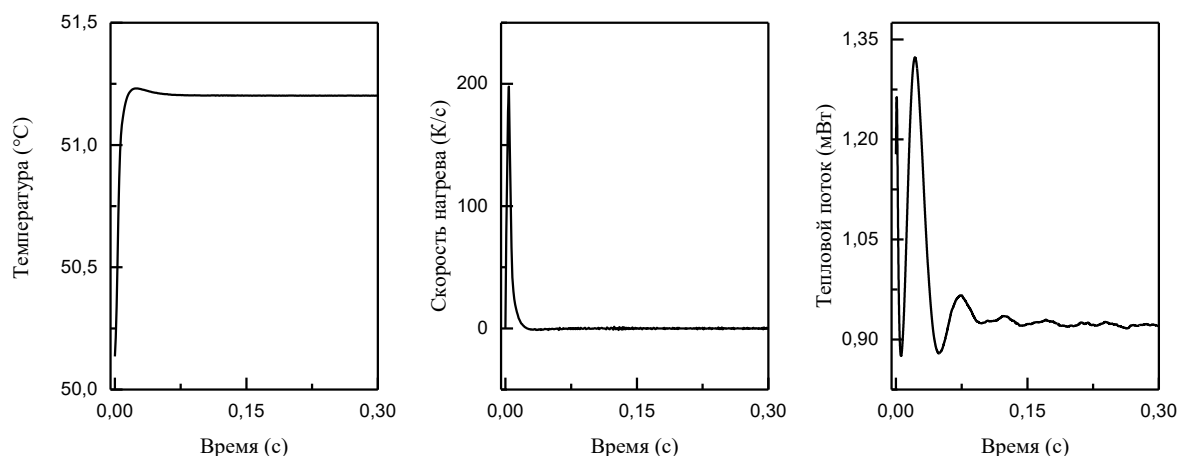


Рисунок 56 – Изменение температуры, скорости нагрева и величины теплового потока в ходе одного периода термомодуляции, записанные при реализации ступенчатого нагрева глицерина на сверхбыстром калориметре FlashDSC2 (Mettler-Toledo) с сенсором NanoLiq Xen-39400.

Сравнительно невысокая скорость охлаждения не позволяет использовать эти чипы для изучения изотермической кинетики фолдинга у белков, время сворачивания которых меньше $\sim 0,1 - 0,5$ с, но при более медленном фолдинге такое исследование принципиально возможно. Вместе с тем для белков с быстрой кинетикой фолдинга с помощью жидкостных калориметрических чипов можно измерить квазиравновесные термодинамические параметры анфолдинга в режиме ступенчатого нагрева.

Как и в случае открытых сенсоров, чувствительность жидкостных чип-сенсоров ограничена. Это требует применения высококонцентрированных растворов белка, в настоящей работе использовали раствор лизоцима в глицерине с концентрацией белка 50 мг/мл и воде 50 - 100 мг/мл. При планировании эксперимента и подборе состава раствора необходимо учитывать возможную агрегацию. Нужно подчеркнуть, что исключительно малые размеры образца, применяемые в чип-калориметрии, определяют крайне малый расход белка. Например, в экспериментах с раствором лизоцима в глицерине, типичная масса белка в одном образце составляла всего ~ 10 - 100 нг. Поэтому применение чип-калориметрии может быть полезным для анализа малых количеств белка, если возможно концентрирование раствора.

Также нужно отметить, что высокие скорости нагрева, доступные сверхбыстрым калориметрам, сокращают время, которое образец проводит при высокой температуре, что позволяет практически исключить протекание процессов необратимой денатурации, таких как дезамидирование.

В заключение хотелось бы отметить, что в настоящее время существует значительный разрыв между характеристиками «классических» ДСК, в том числе капиллярных, и чип-калориметров. Классические ДСК обладают временем отклика порядка сотен секунд и достаточно высокой чувствительностью, позволяющей получать калориметрические кривые анфолдинга белка в растворе с содержанием белка 1%_{масс} и даже ниже. В то же время чип-калориметры имеют время отклика, составляющее доли секунды, но относительно низкую чувствительность. Видится перспективным создание приборов, имеющих время отклика 1 - 10 с, при чувствительности, приближающейся к таковой у классических ДСК, при этом размеры образца были бы промежуточными между классическими ДСК и чип-калориметрами. Такие калориметры могли бы регистрировать анфолдинг белков в квазиравновесных условиях, но за меньшее время и с меньшим расходом образца, чем у классических ДСК.

Заключение

1. Показано, что с помощью метода сверхбыстрой калориметрии можно экспериментально определить кинетические параметры изотермического фолдинга и исследовать состояние неравновесного ансамбля молекул лизоцима в глицерине.
2. Определены кинетические параметры необратимой денатурации лизоцима при повышенных температурах в воде и смеси вода-ДМСО. Показано, что причиной появления форм лизоцима с пониженной термостабильностью и структурой близкой к нативной является реакция дезамидирования;
3. Определены кинетические параметры и механизм фолдинга лизоцима в глицерине, энергия активации и энтальпия анфолдинга интермедиата фолдинга;
4. Показано, что режим ступенчатого сканирования позволяет измерить тепловой эффект анфолдинга микрообразцов белка в квазиравновесных условиях с помощью сверхбыстрой калориметрии;
5. На основе математического моделирования показана зависимость формы кривых ступенчатого нагрева от параметров температурной модуляции и кинетики процесса анфолдинга. Показано, что величина произведения периода модуляции на константу скорости процесса обратимого анфолдинга определяет возможность реализации квазиравновесного режима сканирования;
6. Выработаны критерии, определяющие возможность использования сверхбыстрой калориметрии для исследования процессов анфолдинга и фолдинга белка, в зависимости от массы и концентрации образца, температурного интервала и теплового эффекта анфолдинга.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Разработанные в ходе выполнения диссертационной работы подходы к исследованию анфолдинга и фолдинга белка с помощью сверхбыстрой калориметрии могут быть

применены для исследования других белков, сохраняющих компактную структуру в глицерине, либо демонстрирующих замедленное сворачивание в воде по сравнению с лизоцимом. Для получения более полной информации о состоянии белка в процессе анфолдинга и фолдинга метод сверхбыстрой калориметрии может быть совмещен со спектроскопическими методами – ИК- и Раман-микроскопией. Кроме того, на основе результатов работы могут быть сформулированы требования к новым сканирующим калориметрам, предназначенным для исследования растворов белков.

Список литературы

1. Shea, J.-E. From folding theories to folding proteins: a review and assessment of simulation studies of protein folding and unfolding / J.-E. Shea, C.L. Brooks III // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2001. – Vol. 52, № 1. – P. 499-535.
2. Levinthal, C. Are there pathways for protein folding? / C. Levinthal // *Journal de Chimie Physique.* – 1968. – Vol. 65. – P. 44-45.
3. Honig, B. Protein folding: from the levinthal paradox to structure prediction / B. Honig // *J Mol Biol.* – 1999. – Vol. 293, № 2. – P. 283-293.
4. Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains / C.B. Anfinsen // *Science.* – 1973. – Vol. 181, № 4096. – P. 223-230.
5. Кузнецова, И.М. Структурная динамика, стабильность и фолдинг белков / И.М. Кузнецова, В. Форже, К.К. Туроверов // *Цитология* – 2005. – Том 47, №11. – С. 943-952.
6. Onuchic, J.N. Theory of protein folding / J.N. Onuchic, P.G. Wolynes // *Curr Opin Struct Biol.* – 2004. – Vol. 14, № 1. – P. 70-75.
7. Englander, S.W. The nature of protein folding pathways / S.W. Englander, L. Mayne // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2014. – Vol. 111, № 45. – P. 1-8
8. Dill, K.A. The protein-folding problem, 50 years on / K.A. Dill, J.L. MacCallum // *Science.* – 2012. – Vol. 338. – P. 1042-1046.
9. Wei, G.-W. Protein structure prediction beyond AlphaFold / G.-W. Wei // *Nat Mach Intell. Machine learning for biology.* – 2019. – Vol. 1. – P. 336-337.
10. Finkelstein, A. V. 50+ Years of Protein Folding / A.V. Finkelstein // *Biochemistry (Moscow), Pleiades Publishing.* – 2018. Vol. 83. – P. S3-S18.
11. Eaton, W.A. Modern Kinetics and Mechanism of Protein Folding: A Retrospective / W.A. Eaton // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2021. – Vol. 125, № 14. – P. 3452-3467.
12. Bartlett, A.I. An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms / A.I. Bartlett, S.E. Radford // *Nature Structural and Molecular Biology.* – 2009. – Vol. 16, № 6. – P. 582-588.
13. Anfinsen, C.B. Experimental and theoretical aspects of protein folding. / C.B. Anfinsen, H.A. Scheraga // *Advances in protein chemistry.* – 1973. – Vol. 29. – P. 205-300.
14. Pace, C. N. Forces stabilizing proteins / C.N. Pace, J.M. Scholtz, G.R. Grimsley // *FEBS Letters.* – 2014. – Vol. 588, № 14. – P. 1-8.
15. Ben-Naim, A. Levinthal's question revisited, and answered / A. Ben-Naim // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* – 2012. – Vol. 30, № 1. – P. 113-124.

16. Mallamace, F. Water Thermodynamics and Its Effects on the Protein Stability and Activity / F. Mallamace, D. Mallamace, Chen S.-H., P. Lanzafame, G. Papanikolaou // *Biophysica*. – 2021. – Vol. 1, № 4. – P. 413-428.
17. Privalov, P.L. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study / P.L. Privalov, N.N. Khechinashvili // *Journal of Molecular Biology*. – 1974. – Vol. 86, № 3. – P. 665-684.
18. Privalov, P.L. Microcalorimetry of biological macromolecules / P.L. Privalov, A.I. Dragan // *Biophysical Chemistry*. – 2007. – Vol. 126, № 1-3. – P. 16-24.
19. Neumaier, A. Molecular modeling of proteins and mathematical prediction of protein structure / A. Neumaier // *SIAM Review*. – 1997. – Vol. 39, № 3. – P. 407-460.
20. Prigozhin, M.B. Microsecond folding experiments and simulations: a match is made / M.B. Prigozhin, M. Gruebele // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2013. – Vol. 15, № 10. – P. 3372-3388.
21. Lane, T.J. To milliseconds and beyond: challenges in the simulation of protein folding / T.J. Lane, D. Shukla, K.A. Beauchamp, V.S. Pande // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2012. – Vol. 23, № 1. – P. 58-65.
22. Henry, E.R. Comparing a simple theoretical model for protein folding with all-atom molecular dynamics simulations / E.R. Henry, R.B. Best, W.A. Eaton // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110, № 44. – P. 17880–17885.
23. Scholl, Z.N. Competing Pathways and Multiple Folding Nuclei in a Large Multidomain Protein, Luciferase / Z.N. Scholl, W. Yang, P.E. Marszalek // *Biophysical Journal*. – 2017. – Vol. 112, № 9. – P. 1829-1840.
24. Yang, A.-S. On the pH Dependence of Protein Stability / A.-S. Yang, B. Honig // *Journal of Molecular Biology*. – 1993. – Vol. 231, № 2. – P. 459-474.
25. Dill, K.A. The Protein Folding Problem / K.A. Dill, S.B. Ozkan, M.S. Shell, T.R. Weikl // *Annual Review of Biophysics*. – 2008. – Vol. 37, № 1. – P. 289-316.
26. Griko, Y.V. Denaturation versus unfolding: Energetic aspects of residual structure in denatured α -lactalbumin / Y.V. Griko // *Journal of Protein Chemistry*. – 1999. – Vol. 18, № 3. – P. 361-369.
27. Ahern, T.J. The Mechanism of Irreversible Enzyme Inactivation at 100°C / T.J. Ahern, A.M. Klibanov // *Science*. – 1985. – Vol. 228, № 4705. – P. 1280-1284.
28. Behbehani, G.R. A Comparative Study of the Direct Calorimetric Determination of the Denaturation Enthalpy for Lysozyme in Sodium Dodecyl Sulfate and Dodecyltrimethylammonium Bromide Solutions / G.R. Behbehani, A.A. Saboury, E. Taleshi // *Journal of Solution Chemistry*. – 2008. Vol. 37, № 5. – P. 619-629.

29. de Graaf, L.A. Denaturation of proteins from a non-food perspective / L.A. de Graaf // *Journal of Biotechnology*. – 2000. – Vol. 79, № 3. – P. 299-306.
30. Hamuro, Y. Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry / Y. Hamuro, S.J. Coales, M.R. Southern, J.F. Nemeth-Cawley, D.D. Stranz, P.R. Griffin // *Journal of Biomolecular Techniques*. – 2003. – Vol. 14, № 3. – P. 171-182.
31. Goldberger, R.F. The Reversible Masking of Amino Groups in Ribonuclease and Its Possible Usefulness in the Synthesis of the Protein / R.F. Goldberger, C.B. Anfinsen // *Biochemistry*. – 1962. – Vol. 1, № 3. – P. 401-405.
32. Anfinsen, Jr. C.B. Structural basis of ribonuclease activity / Jr. C.B. Anfinsen // *Federation Proceedings*. – 1957. – Vol. 16, № 3. – P. 783-791.
33. Chi, E.Y. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation / E.Y. Chi, S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter // *Pharmaceutical Research* – 2003. – Vol. 20, № 9. – P. 1325-1336.
34. Mallamace, D. The Role of Hydrogen Bonding in the Folding/Unfolding Process of Hydrated Lysozyme: A Review of Recent NMR and FTIR Results / D. Mallamace, E.Fazio, F. Mallamace, C. Corsaro // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 3825. – P. 1-21.
35. Cooper, A. Thermodynamics of protein folding and stability // *Protein: A comprehensive treatise*. / Stamford, Connecticut; editor G. Allen – 1999. – Chapter 6. – P. 217-270.
36. Lumry, R. Conformation Changes of Proteins / R. Lumry, H. Eyring // *J Phys Chem*. – 1954. – Vol. 58, № 2. – P. 110-120.
37. Sanchez-Ruiz, J.M. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry // *Biophys J*. – 1992. – Vol. 61, № 4. – P. 921-935.
38. Roberts, C.J. Kinetics of Irreversible Protein Aggregation: Analysis of Extended Lumry–Eyring Models and Implications for Predicting Protein Shelf Life / C.J.Roberts // *J Phys Chem B*. – 2003. – Vol. 107, № 5. – P. 1194-1207.
39. Ueda, T. Aggregation and Chemical Reaction in Hen Lysozyme Caused by Heating at pH 6 Are Depressed by Osmolytes, Sucrose and Trehalose / T. Ueda, M. Nagata, T. Imoto // *J Biochem*. – 2001. – Vol. 130, № 4. – P. 491-496.
40. Weber, K. Reversible Denaturation of Enzymes by Sodium Dodecyl Sulfate / K. Weber, D.J. Kuter // *Journal of Biological Chemistry*. – 1971. – Vol. 246, № 14. – P. 4504-4509.
41. Senisterra, G. Thermal Denaturation Assays in Chemical Biology / G. Senisterra, I. Chau, M. Vedadi // *ASSAY and Drug Dev Technol*. – 2012. – Vol. 10, № 2. – P. 128-136.
42. Tang, C.-H. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry /

- C.-H. Tang, S.-M. Choi, C.-Y. Ma // *Int J Biol Macromol.* – 2007. – Vol. 40, № 2. – P. 96-104.
43. Nikolaidis, A. On the reversibility of ethanol-induced whey protein denaturation / A. Nikolaidis, T. Moschakis // *Food Hydrocoll.* – 2018. – Vol. 84. – P. 389-395.
44. Bischof, J.C. Thermal Stability of Proteins / J.C. Bischof, X. He // *Ann N Y Acad Sci.* – 2005. – Vol. 1066, № 1. – P. 12-33.
45. Iwakura, M. An approach for protein to be completely reversible to thermal denaturation even at autoclave temperatures / M. Iwakura, D. Nakamura, T. Takenawa, Y. Mitsuishi // *Protein Engineering, Design and Selection.* – 2001. – Vol. 14, № 8. – P. 583-589.
46. Ben-Naim, A. Theory of cold denaturation of proteins / A. Ben-Naim // *Advances in Biol Chem.* – 2013. – Vol. 03, № 01. – P. 29-39.
47. Privalov, P.L. Cold denaturation of protein / P.L. Privalov // *Critical Reviews in Biochem and Mol Biol.* – 1990. – Vol. 25, № 4. – P. 281-306.
48. Privalov, P.L. Cold denaturation of myoglobin / P.L. Privalov // *J Mol Biol.* – 1986. – Vol. 190, № 3. – P. 487-498.
49. Wu, H. Studies on denaturation of proteins XIII. A theory of denaturation / H. Wu // *Adv Protein Chem.* – 1995. – Vol. 46. – P. 6-26.
50. England, J.L. Role of solvation effects in protein denaturation: From thermodynamics to single molecules and back / J.L England., G. Haran // *Annu Rev Phys Chem.* – 2011. – Vol. 62. P. 257-277.
51. Pohl, F.M. Einfache Temperatursprung-Methode im Sekundenbis Stundenbereich und die reversible Denaturierung von Chymotrypsin / F.M. Pohl // *European J Biochem.* – 1968. – Vol. 4, № 3. – P. 373-377.
52. Schechter, A.N. Kinetics of folding of staphylococcal nuclease / A.N. Schechter, R.F. Chen, C.B. Anfinsen // *Science.* – 1970. – Vol. 167, № 3919. – P. 886-887.
53. Tsong, T.Y. A sequential model of nucleation-dependent protein folding: Kinetic studies of ribonuclease A / T.Y. Tsong, R.L. Baldwin // *J Mol Biol.* – 1972. – Vol. 63, № 3. – P. 453-469.
54. Shastry, M.C.R., Roder H. Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale / M.C.R. Shastry, H. Roder // *Nat Struct Biol.* – 1998. – Vol. 5, № 5. – P. 385-392.
55. Jackson, S.E. How do small single-domain proteins fold? / S.E. Jackson // *Folding and Design.* – 1998. – Vol. 3, № 4. – P. R81-R91.
56. Bogatyreva, N.S. KineticDB: A database of protein folding kinetics / N.S. Bogatyreva, A.A. Osypov, D.N. Ivankov // *Nucleic Acids Research.* – 2009. – Vol. 37. P. D342-D346.
57. Galzitskaya, O.V. Chain length is the main determinant of the folding rate for proteins with three-state folding kinetics / O.V. Galzitskaya, S.O.

- Garbuzynskiy, D.N. Ivankov, A.V. Finkelstein // *Proteins: Structure, Function and Genetics*. – 2003. – Vol. 51, № 2. – P. 162-166.
58. Kuwajima, K. The molten globule, and two-state vs. Non-two-state folding of globular proteins / K. Kuwajima // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 3. – P. 1-17.
59. Zwanzig, R. Two-state models of protein folding kinetics / R. Zwanzig // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1997. – Vol. 94, № 1. – P. 148-150.
60. Schonbrun, J. Fast protein folding kinetics / J. Schonbrun, K.A. Dill // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2003. – Vol. 100, № 22. – P. 12678-12682.
61. Rollins, G.C. General mechanism of two-state protein folding kinetics / G.C. Rollins, K.A Dill // *J of the American Chem Soc*. – 2014. – Vol. 136, № 32. – P. 11420-11427.
62. Garcia-Mira, M.M. Experimental identification of downhill protein folding / M.M. Garcia-Mira, M. Sadqi, N. Fischer, J.M. Sanchez-Ruiz, V. Muñoz // *Science*. – 2002. – Vol. 298, № 5601. – P. 2191-2195.
63. Malhotra, P. How cooperative are protein folding and unfolding transitions? / P. Malhotra, J.B. Udgaonkar // *Protein Science*. – 2016. – Vol. 25, № 11. – P. 2-45.
64. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins / A. Barth // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. – 2007. – Vol. 1767, № 9. – P. 1073-1101.
65. Margolies, M.N. Sequencing of Proteins and Peptides. G. Allen. // *Q Rev Biol*, / Netherlands; edited by T.S.Work, R.H.Burdon. – 1982. – Chapter 1 – Vol. 57, № 3. P. 1-15.
66. Gallagher, W. FTIR analysis of protein structure / W. Gallagher // *Course manual Chem*. – 1997. – Vol. 455, № 1958. – P. 1-8.
67. Rygula, A. Raman spectroscopy of proteins: a review / A. Rygula, K. Majzner, K.M. Marzec, A. Kaczor M. Pilarczyk, M. Baranska// *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2013. – Vol. 44, № 8. – P. 1061-1076.
68. Kelly, S.M. How to study proteins by circular dichroism / S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price // *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*. – 2005. – Vol. 1751, № 2. – P. 119-139.
69. Miles, A.J. DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data / A.J. Miles, S.G. Ramalli, B.A. Wallace // *Protein Science*. – 2021. – Vol. 31, № 1. – P. 1-10.
70. Greenfield, N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure / N.J. Greenfield // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 1, № 6. – P. 2876-2890.
71. Raleigh, D.P. Protein Stability and Folding: Theory and Practice. Bret A. Shirley // *Methods in molecular biology*. – 1996. – Vol. 71, № 4. – pp. 379.
72. Pace, C.N. Measuring the conformational stability of a protein. / C.N. Pace, B.A. Shirley, J.A. Tomson // – 1997. – Chapter 13. – P. 311-330.

73. Saini, K. Relationship between the wavelength maximum of a protein and the temperature dependence of its intrinsic tryptophan fluorescence intensity / K. Saini, S. Deep // *European Biophysics Journal*. 2010. Vol. 39, № 10. P. 1446-1451.
74. Pelton, J.T. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure / J.T. Pelton, L.R. McLean // *Analytical Biochemistry*. 2000. Vol. 277, № 2. P. 167-176.
75. Wüthrich, K. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy / K. Wüthrich // *Science*. – 1989. – Vol. 243, № 4887. P. 45-50.
76. Wishart, D.S. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure / D.S. Wishart, B.D. Sykes, F.M. Richards // *J Mol Biol*. – 1991. – Vol. 222, № 2. – P. 311-333.
77. Roder, H. Methods for exploring early events in protein folding / H. Roder, M.C.R. Shastry // *Curr Opin Struct Biol*. – 1999. – Vol. 9, № 5. – P. 620–626.
78. Backmann, J. Temperature-jump-induced refolding of ribonuclease A: a time-resolved FTIR spectroscopic study / J. Backmann, H. Fabian, D. Naumann // *FEBS Lett*. – 1995. – Vol. 364, № 2. – P. 175–178.
79. Radford, S.E. The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways / S.E. Radford, C.M. Dobson, P.A. Evans // *Nature*. – 1992. – Vol. 358. – P. 302–307.
80. Park, S.H. Folding mechanism of WT ubiquitin variant studied by stopped-flow fluorescence spectroscopy / S.H. Park // *Bull Korean Chem Soc*. – 2010. – Vol. 31, № 10. – P. 2877-2883.
81. Pace, C.N. A New Method for Determining the Heat Capacity Change for Protein Folding / C.N. Pace, D.V. Laurents // *Biochemistry*. – 1989. – Vol. 28, № 6. – P. 2520-2525.
82. Guzzi, R. A spectroscopic and calorimetric investigation on the thermal stability of the Cys3Ala/Cys26Ala azurin mutant / R. Guzzi, L. Sportelli, C. La Rosa, D. Milardi, D. Grasso, M.Ph. Verbeet, G.W. Canters // *Biophys J*. – 1999. – Vol. 77, № 2. – P. 1052-1063.
83. Royer, C.A. Approaches to teaching fluorescence spectroscopy / C.A. Royer // *Biophys J*. – 1995. – Vol. 68, № 3. – P. 1191-1195.
84. Boys, B.L. A temperature-jump stopped-flow system for monitoring chemical kinetics triggered by rapid cooling / B.L. Boys, L. Konermann // *Talanta*. – 2007. – Vol. 71, № 3. – P. 1276–1281.
85. Torrent, J. Distinct Unfolding and Refolding Pathways of Ribonuclease A Revealed by Heating and Cooling Temperature Jumps / J. Torrent, S. Marchal, M. Ribó, M. Vilanova, C. Georges, Y. Dupont, R. Lange // *Biophys J*. – 2008. – Vol. 94, № 10. – P. 4056–4065.
86. Kachlishvili, K. Eliminating a Protein Folding Intermediate by Tuning a Local Hydrophobic Contact / K. Kachlishvili, K. Dave, M. Gruebele, H.A. Scheraga,

- G.G. Maisuradze // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2017. – Vol. 121, № 15. – P. 1-40.
87. Marchand, A. Studying biomolecular folding and binding using temperature-jump mass spectrometry / A. Marchand, M.F. Czar, E.N. Eggel, J. Kaeslin, R. Zenobi // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 1-12.
88. Lepock, J.R. Measurement of protein stability and protein denaturation in cells using differential scanning calorimetry / J.R. Lepock // *Methods.* – 2005. – Vol. 35, № 2. – P. 117-125.
89. Fundamentals of DSC // *Handbook of Differential Scanning Calorimetry* / edited by J.D. Menczel, J.Grebowicz. – 2023. – Chapter 1, P. 1-189.
90. Ibarra-Molero, B. Modern Analysis of Protein Folding by Differential Scanning Calorimetry / B. Ibarra-Molero, A.N. Naganathan, J.M. Sanchez-Ruiz, V. Muñoz // *Methods in Enzymology.* – 2016. – P. 277–314.
91. Johnson, C.M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability // *Arch Biochem Biophys.* 2013. Vol. 531, № 1–2. P. 100–109.
92. Sanchez-Ruiz, J.M. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin / M.J. Sanchez-Ruiz, J.L. Lopez-Lacomba, M. Cortijo, P.L. Mateo // *Biochemistry.* 1988. Vol. 27, № 5. P. 1648–1652.
93. Shnyrov, V.L. Applications of scanning microcalorimetry in biophysics and biochemistry / V.L. Shnyrov, J.M. Sanchez-Ruiz, B.N. Boiko, G.G. Zhadan, E.A. Permyakov // *Thermochim Acta.* – 1997. – Vol. 302, № 1–2. – P. 165–180.
94. Grinberg, V.Ya. Interpretation of DSC data on protein denaturation complicated by kinetic and irreversible effects / V.Ya. Grinberg, T.V. Burova, T. Haertlé, V.B. Tolstoguzov // *J Biotechnol.* – 2000. – Vol. 79, № 3. P. 269–280.
95. Privalov, P.L. Microcalorimetry of Proteins and Their Complexes / P.L. Privalov // *Protein Structure, Stability and Interaction.* – 2009. – Vol. 490. – P. 1–39.
96. Spinozzi, F. Microcalorimetric study of thermal unfolding of lysozyme in water/glycerol mixtures: An analysis by solvent exchange model / F. Spinozzi // *J Chem Phys.* – 2008. – Vol. 129, № 3. – P. 1-10.
97. Sanchez-Ruiz, J.M. Probing free-energy surfaces with differential scanning calorimetry / J.M. Sanchez-Ruiz // *Annu Rev Phys Chem.* – 2011. – Vol. 62. – P. 231-255.
98. Li-Blatter, X. Thermal and chemical unfolding of lysozyme. Multistate Zimm-Bragg theory versus two-state model / X. Li-Blatter, J. Seelig // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2019. – Vol. 123, № 48. – P. 10181-10191.
99. Privalov, P.L. Thermodynamic analysis of thermal transitions in globular proteins. I. Calorimetric study of ribotrypsinogen, ribonuclease and myoglobin / P.L. Privalov, N.N. Khechinashvili, B.P. Atanasov // *Biopolymers.* – 1971. – Vol. 10, № 10. – P. 1865-1890.

100. Privalov, P.L. Microcalorimetry of Macromolecules: The Physical Basis of Biological Structures / P.L. Privalov // *J Solution Chem.* – 2015. – Vol. 44, № 5. – P. 1141-1161.
101. Cao, X. Protein denaturation kinetic processes of a simple and a complex reaction mechanism analyzed by an iso-conversional method / X. Cao, Y. Tian, Z. Wang, Y. Liu, C. Wang // *J Therm Anal Calorim.* – 2014. – Vol. 117, № 3. – P. 1489-1495.
102. Lyubarev, A.E. Analysis of DSC data relating to proteins undergoing irreversible thermal denaturation / A.E. Lyubarev, B.I. Kurganov // *J Therm Anal Calorim.* – 2000. – Vol. 62, № 1. – P. 51-62.
103. Mazurenko, S. Exploration of protein unfolding by modelling calorimetry data from reheating / S. Mazurenko, A.Kunka, K. Beerens, C.M Johnson, J. Damborsky, Z.Prokop // *Sci Rep. Nature Publishing Group* –2020. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 1-14.
104. Privalov, G. Precise scanning calorimeter for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute solution / G. Privalov, V. Kavina, E. Freire, P.L. Privalov // *Anal Biochem.* – 1995. – Vol. 232, № 1. – P. 79-85.
105. Zhu, H. The development of ultrasensitive microcalorimeters for bioanalysis and energy balance monitoring / H. Zhu, L. Wang, J. Feng, P. Neuzil // *Fundamental Research.* – 2023.
106. Hong, S. Sub-nanowatt microfluidic single-cell calorimetry / S. Hong, E. Dechaumpai, C.R. Green, R. Lal, A.N. Murphy, C.M. Metallo, R. Chen // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 1-9.
107. Schick, C. Fast Scanning Calorimetry of Organic Materials from Low Molecular Mass Materials to Polymers / C. Schick, T.A. Mukhametzyanov, B.N. Solomonov // *Reviews and Advances in Chemistry.* – 2021. – Vol. 11. – P. 1-72.
108. Mathot, V. The Flash DSC 1, a power compensation twin-type, chip-based fast scanning calorimeter (FSC): First findings on polymers / V. Mathot, M. Pyda, T. Pijpers, G.V. Poel, E. van de Kerkhof, S. van Herwaarden, F. van Herwaarden, A. Leenaers // *Thermochim Acta.* – 2011. – Vol. 522, № 1–2. P. 36-45.
109. Advanced instrumentation, techniques and methods // *Fast Scanning Calorimetry* / edited by C. Schick, V. Mathot; Cham: Springer International Publishing. – 2016. – Chapter 1, P. 3-32.
110. Zally, G.D. Fluctuation heat capacity in superconducting thin films of amorphous BiSb / G.D. Zally, J.M. Mochel // *Phys Rev Lett.* – 1971. – Vol. 27, № 25. – P. 1710-1712.
111. Denlinger, D.W. Thin film microcalorimeter for heat capacity measurements from 1.5 to 800 K / D.W. Denlinger, E.N. Abarra, K. Allen, R.W. Rooney, M.T. Messer, S.K. Watson, F Hellman // *Review of Scientific Instruments.* – 1994. – Vol. 65, № 4. – P. 946-959.

112. Lai, S.L. High-speed (10^4 °C/s) scanning microcalorimetry with monolayer sensitivity (J/m^2) / S.L. Lai, G. Ramanath, L.H. Allen, P. Infante, Z. Ma // *Appl Phys Lett.* – 1995. – Vol. 67. – P. 1229-1231.
113. Efremov, M.Yu. Thin-film differential scanning nanocalorimetry: Heat capacity analysis / M.Yu. Efremov, E.A. Olson, M. Zhang, S.L. Lai, F. Schiettekatte, Z.S. Zhang, L.H. Allen // *Thermochim Acta.* – 2004. – Vol. 412, № 1-2. – P. 13-23.
114. Efremov, M.Yu. Thin-film differential scanning calorimetry: A new probe for assignment of the glass transition of ultrathin polymer films / M.Yu. Efremov, J.T. Warren, E.A. Olson, M. Zhang, A.T. Kwan, L.H. Allen // *Macromolecules.* – 2002. – Vol. 35, № 5. – P. 1481-1483.
115. Efremov, M.Yu. Probing glass transition of ultrathin polymer films at a time scale of seconds using fast differential scanning calorimetry / M.Yu. Efremov, E.A. Olson, M. Zang, Z. Zang, L.A. Allen // *Macromolecules.* – 2004. – Vol. 37, № 12. – P. 4607-4616.
116. Zhang, M. Real-time heat capacity measurement during thin-film deposition by scanning nanocalorimetry / M. Zhang, M.Yu. Efremov, E.A. Olson, Z. S. Zhang, L.H. Allen // *Appl Phys Lett.* – 2002. – Vol. 81, № 20. – P. 3801-3803.
117. Adamovsky, S.A. Scanning microcalorimetry at high cooling rate / S.A. Adamovsky, A.A. Minakov, C. Schick // *Thermochimica Acta.* – 2003. – Vol. 403, № 1. – P. 55-63.
118. Merzlyakov, M. Method of rapid ($100\,000\text{ K s}^{-1}$) controlled cooling and heating of thin samples / M. Merzlyakov // *Thermochim Acta.* – 2006. – Vol. 442, № 1-2. – P. 52-60.
119. Zhuravlev, E. Fast scanning power compensated differential scanning nanocalorimeter: 1. The device / E. Zhuravlev, C. Schick // *Thermochim Acta.* – 2010. – Vol. 505, № 1-2. – P. 1-13.
120. Zhuravlev, E. Non-Adiabatic Scanning Calorimeter for Controlled Fast Cooling and Heating // *Fast Scanning Calorimetry* / edited by C. Schick, V. Mathot; Cham: Springer International Publishing. – 2016. – Chapter 2, P. 81-104.
121. Zhuravlev, E. Experimental Test of Tammann's Nuclei Development Approach in Crystallization of Macromolecules / E. Zhuravlev, J. Schmelzer, A.S. Abyzov, V.M. Fokin, R. Androsch, C. Schick // *Cryst Growth Des.* – 2015. – Vol. 15, № 2 – P. 786-798.
122. Zhang, R. Nucleation and crystallization kinetics of polyamide 12 investigated by fast scanning calorimetry / R. Zhang, K. Jariyavidyanont, M. Du, E. Zhuravlev, C. Schick, R. Androsch // *Journal of Polymer Science.* – 2022. – Vol. 60, № 5. – P. 842-855.
123. Mukhametzyanov, T. Crystal nucleation and growth in cross-linked poly(ϵ -caprolactone) (PCL) / T. Mukhametzyanov, J.W.P. Schmelzer, E. Yarko, A.

- Abdullin, M. Ziganshin, I. Sedov, C. Schick // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13, № 21. – P. 1-21.
124. Rodríguez-Tinoco, C. Emergence of a substrate-temperature-dependent dielectric process in a prototypical vapor deposited hole-transport glass / C. Rodríguez-Tinoco, M. Rams-Baron, J. Rodríguez-Viejo, M. Paluch // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1-10.
125. Lapuk, S.E. Crystallization kinetics and glass-forming ability of rapidly crystallizing drugs studied by Fast Scanning Calorimetry / S.E. Lapuk, T.A. Mukhametzyanov, C. Schick, A.V. Gerasimov // *Int J Pharm*. – 2021. – Vol. 599. P. 1-8.
126. Minakov, A. High-speed dynamics of temperature distribution in ultrafast (up to 10^8 K/s) chip-nanocalorimeters, measured by infrared thermography of high resolution // *J Appl Phys*. 2019. Vol. 125, № 5. P. 054501.
127. Ahrenberg, M. Determination of volatility of ionic liquids at the nanoscale by means of ultra-fast scanning calorimetry / M. Ahrenberg, M. Brinckmann, J.W.P. Schmelzer, M. Beck, C. Schmidt, O. Keßler, Udo Kragl, S.P. Verevkin, C. Schick // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – Vol. 16, № 7. – P. 1-10.
128. Gaisford, S. Pharmaceutical physical form characterisation with fast (>200 °C min⁻¹) DSC heating rates / S. Gaisford, A.B.M. Buanz // *J Therm Anal Calorim*. – 2011. – Vol. 106, № 1. – P. 221–226.
129. Abdelaziz, A. Melting temperature and heat of fusion of cytosine revealed from fast scanning calorimetry / A. Abdelaziz, D.H. Zaitsau, T.A. Mukhametzyanov, B.N. Solomonov, P. Cebe, S.P. Verevkin, C. Schick // *Thermochim Acta*. – 2017. – Vol. 657. – P. 47–55.
130. Abdelaziz, A. Fast scanning calorimetry: Sublimation thermodynamics of low volatile and thermally unstable compounds / A. Abdelaziz, D.H. Zaitsau, A. Buzyurov, A.A. Minakov, S.P. Verevkin, C. Schick // *Thermochim Acta*. – 2019. – Vol. 676. – P. 249-262.
131. Yagofarov, M.I. Application of fast scanning calorimetry to the fusion thermochemistry of low-molecular-weight organic compounds: Fast-crystallizing m-terphenyl heat capacities in a deeply supercooled liquid state / M.I. Yagofarov, S.E. Lapuk, T.A. Mukhametzyanov, M.A. Ziganshin, C. Schick, B.N. Solomonov // *Thermochim Acta*. – 2018. – Vol. 668. – P. 96-102.
132. Abdelaziz, A. Sublimation thermodynamics of nucleobases derived from fast scanning calorimetry / A. Abdelaziz, D.H. Zaitsau, A.V. Buzyurov, S.P. Verevkin, C. Schick // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2020. – Vol. 22, № 2. – P. 838-853.
133. Splinter, R. Analyzing Protein Denaturation using Fast Differential Scanning Calorimetry / R. Splinter, A.W. van Herwaarden, E. Iervolino, G.V. Poel, D. Istrate, P.M. Sarro // *Procedia Eng*. – 2012. – Vol. 47. – P. 140-143.
134. Cebe, P. Beating the heat-fast scanning melts silk beta sheet crystals / P. Cebe, X. Hu, D.L. Kaplan, E. Zhuravlev, A. Wurm, D. Arbeiter, C. Schick // *Sci Rep*. – 2013. – Vol. 3. P. 1-7.

135. Fast scanning calorimetry of silk fibroin protein: Sample mass and specific heat capacity determination / P Cebe, B.P. Partlow, D.L. Kaplan, A. Wurm, E. Zhuravlev, C. Schick // *Fast Scanning Calorimetry* / edited by C. Schick, V. Mathot; Cham: Springer International Publishing. – 2016. – P. 187-203.
136. Cebe, P. Silk I and Silk II studied by fast scanning calorimetry / P. Cebe, B.P. Partlow, D.L. Kaplan, A. Wurm, E. Zhuravlev, C. Schick // *Acta Biomater.* – 2017. – Vol. 55. – P. 323-332.
137. Splinter, R. Fast differential scanning calorimetry of liquid samples with chips / R. Splinter, A.W. van Herwaarden, I.A. van Wetten, A. Pfreundt, W.E. Svendsen // *Thermochim Acta.* – 2015. – Vol. 603. – P. 162-171.
138. Splinter, R. Measuring human blood serum with chip based fast liquid differential scanning calorimetry / R. Splinter, A.W. van Herwaarden, S. Pastorekova, T.C. Linders, T. Korse, D. van den Broek // *Thermochim Acta.* – 2016. – Vol. 639. – P. 76-83.
139. Mukhametzyanov, T.A. Fast scanning calorimetry of lysozyme unfolding at scanning rates from 5 K/min to 500,000 K/min / T.A. Mukhametzyanov, I.A. Sedov, B.N. Solomonov, C. Schick // *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* Elsevier B.V. – 2018. – Vol. 1862, № 9. – P. 2024-2030.
140. Wu, L. Equilibrium and kinetic analysis on the folding of hen egg lysozyme in the aqueous-glycerol solution / L.-Z. Wu, B.-L. Ma, Y.-B. Sheng, W. Wang // *J Mol Struct.* – 2008. – Vol. 891, № 1–3. – P. 167-172.
141. Knubovets, T. Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol / T. Knubovets, J.J. Osterhout, P.J. Connolly, A.M. Klibanov // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1999. – Vol. 96, № 4. – P. 1262-1267.
142. Burova, T.V. Calorimetric evidence for a native-like conformation of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol / T.V. Burova, N.V. Grinberg, V.Ya. Grinberg, R.V. Rariy, A.M. Klibanov // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Protein Structure and Molecular Enzymology.* – 2000. – Vol. 1478, № 2. – P. 309-317.
143. Joshi, K. Quasi-native transition and self-diffusion of proteins in water-glycerol mixture / K. Joshi, A.K. Bhuyan // *Biophys Chem.* – 2020. – Vol. 257. P. 1-12.
144. Staub, H. New method of purity determination by means of calorimetric differential thermal analysis / H. Staub, W. Perron // *Anal Chem.* – 1974. – Vol. 46, № 1. – P. 128-130.
145. Merzlyakov, M. Step response analysis in DSC — a fast way to generate heat capacity spectra / M. Merzlyakov, C. Schick // *Thermochim Acta.* – 2001. – Vol. 380, № 1. – P. 5-12.
146. Merzlyakov, M. Simultaneous multi-frequency TMDSC measurements / M. Merzlyakov, C. Schick // *Thermochim Acta.* – 2001. – Vol. 377, № 1–2. – P. 193-204.
147. Shoifet, E. Temperature modulated differential scanning calorimetry - Extension to high and low frequencies / E. Shoifet, G. Schulz, C. Schick // *Thermochim Acta.* Elsevier B.V. – 2015. – Vol. 603. – P. 227-236.
148. Monnier, X. Effect of molecular weight on vitrification kinetics and molecular mobility of a polymer glass confined at the microscale / X. Monnier, D. Cangialosi // *Thermochim Acta.* Elsevier B.V. – 2019. – Vol. 677. P. 60-66.

149. Toda, A. Fast-scan and temperature-modulated calorimetry of recrystallization of poly(ethylene terephthalate) / A. Toda // *Thermochim Acta.* – 2019. – Vol. 682. – P. 1-9.
150. Wurm, A. Reversible melting during crystallization of polymers studied by temperature modulated techniques (TMDSC, TMDMA) / A. Wurm, M. Merzlyakov, C. Schick // *J Therm Anal Calorim.* – 2000. – Vol. 60, № 3. – P. 807-820.
151. Chachorovska, M. Thermal analysis assisted by spectra-structure studies of BCS class II active pharmaceutical ingredients: ezetimibe and lercanidipine hydrochloride. The concept of preformulation / M. Chachorovska, G. Petrushevski, M.S. Pecova, S. Ugarkovic, P. Makreski // *J Therm Anal Calorim.* – 2022. – Vol. 147, № 16. – P. 8779-8790.
152. Badkar, A. Application of TZERO calibrated modulated temperature differential scanning calorimetry to characterize model protein formulations / A. Badkar, P. Yohannes, A. Banga // *Int J Pharm.* – 2006. – Vol. 309, № 1-2. – P. 146-156.
153. Salvetti, G. The endothermic effects during denaturation of lysozyme by temperature modulated calorimetry and an intermediate reaction equilibrium / G. Salvetti, E. Tombari, L. Mikheeva, and G.P. Johari // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2002. – Vol. 106, № 23. – P. 6081-6087.
154. Hédoux, A. Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: A Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation / A. Hédoux, R. Ionov, J.-F. Willart, A. Lerbret, F. Affouard, Y. Guinet, M. Descamps, D. Prévost, L. Paccou, F. Danéde // *J Chem Phys.* – 2006. – Vol. 124, № 1. – P. 1-8.
155. Kotelnikov, G.V. High-sensitivity modulation differential scanning calorimetry of protein denaturation / G.V. Kotelnikov, S.P. Moiseeva, T.V. Burova, N.V. Grinberg, A.Ya. Mashkevich, A.S. Dubovik, V.Ya. Grinberg // *J Therm Anal Calorim.* – 2013. – Vol. 114, № 2. – P. 531-536.
156. Kotelnikov, G.V. Modulation nanocalorimeter in research of thermal denaturation of proteins / G.V. Kotelnikov, S.P. Moiseyeva // *NAUCHNOE PRIBOROSTROENIE.* – 2015. – Vol. 25, № 2. – P. 40-44.
157. Разрушение клеток и экстракция // Выделение и очистка белков / под ред. В.В. Сова, М.И. Кусайкин: Изд-во Дальневост. ун-та. Владивосток. – 2006. – С. 7-8.
158. Lesnierowski, G. Lysozyme / G. Lesnierowski, J. Kijowski // *Bioactive Egg Compounds*, Springer – 2007. – Chapter 6, P. 33–42.
159. Fleming, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions / A. Fleming // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B.* – 1922. – Vol. 93, № 653. – P. 306-317.
160. Lysozyme: a model enzyme in protein chemistry // *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology* / edited by Jollès P. *Experientia Suppl.* – 1996. – Vol. 75. – 449 pp.
161. Helal, R. Determination of lysozyme activity by a fluorescence technique in comparison with the classical turbidity assay / R. Helal, M.F. Melzig // *Pharmazie.* – 2008. – Vol. 63, № 6. – P. 415-419.
162. Blake, C.C.F. Structure of hen egg-white lysozyme: a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution / C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair,

- A.C.T. North, D.C. Phillips, V.R. Sarma // Nature. Nature Publishing Group. – 1965. – Vol. 206, № 4986. – P. 757-761.
163. Phillips, D.C. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. / D.C. Phillips // Sci Am. – 1966. – Vol. 215, № 5. – P. 78-93.
164. Sophianopoulos, A.J. Physical studies of lysozyme: I. Characterization / A.J. Sophianopoulos, C.K. Rhodes, D.N. Holcomb, K.E. Van Holde // Journal of Biological Chemistry. – 1962. – Vol. 237, № 4. – P. 1107-1112.
165. Sigma-Aldrich Lysozyme (L7651) - Datasheet [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/362/900/17651dat.pdf> - Дата обращения: 25.05.2023.
166. Wu, T. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review / T. Wu, Q. Jiang, D. Wu, Y. Hu, S. Chen, T. Ding, X. Ye, D. Liu, J. Chen // Food Chem. – 2019. – Vol. 274. – P. 698-709.
167. Matagne, A. The folding process of hen lysozyme: A perspective from the “new view” / A. Matagne, C.M. Dobson // Cellular and Molecular Life Sciences. – 1998. – Vol. 54, № 4. – P. 363-371.
168. BMRB Featured System: Lysozyme [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bmr.io/featuredSys/Lysozyme/> - Дата обращения: 25.05.2023.
169. Chayen, N.E. Is lysozyme really the ideal model protein? / N.E. Chayen, E. Saridakis // Journal of Crystal Growth. – 2001. – Vol. 232, № 1-4. – P. 262-264.
170. Fujita, Y. Effect of Hydration on the Thermal Denaturation of Lysozyme as Measured by Differential Scanning Calorimetry / Y. Fujita, Y. Noda // Bull Chem Soc Jpn. – 1978. – Vol. 51, № 5. – P. 1567-1568.
171. Ogasahara, K. Structure of lysozyme: XII. effect of pH on the stability of lysozyme / K. Ogasahara, K. Hamaguchi // J Biochem. – 1967. – Vol. 61, № 2. – P. 199-210.
172. Velicelebi, G. Thermodynamics of the Denaturation of Lysozyme in Alcohol-Water Mixtures / G. Velicelebi, J.M. Sturtevant // Biochemistry. – 1979. – Vol. 18, № 7. – P. 1180-1186.
173. Chang, J.Y. The unfolding mechanism and the disulfide structures of denatured lysozyme / J.-Y. Chang, L. Li // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 511, № 1-3. – P. 73-78.
174. Stavropoulos, P. The effect of cations on reversibility and thermodynamic stability during thermal denaturation of lysozyme / P. Stavropoulos, A. Thanassoulas, G. Nounesis // Journal of Chemical Thermodynamics. – 2018. – Vol. 118. – P. 331-337.
175. Caccamo, M.T. Multiscale spectral analysis on lysozyme aqueous solutions in the presence of polyethyleneglycol / M.T. Caccamo, S. Magazù // Molecules. – 2022. – Vol. 27, № 24. – P. 1-9.
176. James, S. Thermal and solution stability of lysozyme in the presence of sucrose, glucose, and trehalose / S. James, J.J. McManus // Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – Vol. 116, № 34. – P. 10182-10188.
177. Fujita, Y. Effect of dimethylsulfoxide and its homologues on the thermal denaturation of lysozyme as measured by differential scanning calorimetry /

- Y. Fujita, S. Izumiguchi, Y. Noda // *Int J Pept Protein Res.* – 2009. – Vol. 19, № 1. – P. 25-31.
178. Giugliarelli, A. Denaturation and Preservation of Globular Proteins: The Role of DMSO / A. Giugliarelli, M. Paolantoni, A. Morresi, P. Sassi // *J Phys Chem B.* – 2012. – Vol. 116, № 45. – P. 13361-13367.
179. Torreggiani, A. Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: A calorimetric and Raman study / A. Torreggiani, M. Di Foggia, I. Manco, A. De Maio, S.A. Markarian, S. Bonora // *J Mol Struct.* 2008. Vol. 891, № 1–3. P. 115–122.
180. Luo, J.J. Denaturation behaviors of two-state and non-two-state proteins examined by an interruption-incubation protocol / J.-J. Luo, F.-G. Wu, J.-S. Yu, R. Wang, Z.-W. Yu // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2011. – Vol. 115, № 28. – P. 8901-8909.
181. Cao, A. Linear Correlation between Thermal Stability and Folding Kinetics of Lysozyme / A. Cao, G. Wang, Y. Tang, L. Lai // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – Vol. 291, № 4. – P. 795-797.
182. Wildegger, G. Three-state model for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate / G. Wildegger, T. Kiefhaber // *J Mol Biol.* – 1997. – Vol. 270, № 2. – P. 294-304.
183. Xing, L. Multistate Mechanism of Lysozyme Denaturation through Synchronous Analysis of Raman Spectra / L. Xing, K. Lin, X. Zhou, S. Liu, Y. Luo // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2016. – Vol. 120, № 41. – P. 1-24.
184. Pirzadeh, P. Chemometric studies of lysozyme upon interaction with sodium dodecyl sulfate and β -cyclodextrin / P. Pirzadeh, A.A. Moosavi-Movahedi, B. Hemmateenejad, F. Ahmad, M. Shamsipur, A.A. Saboury // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2006. – Vol. 52, № 1. – P. 31-38.
185. Pfeil, W. Thermodynamic investigations of proteins. I. Standard functions for proteins with lysozyme as an example / W. Pfeil, P.L. Privalov // *Biophys Chem.* – 1976. – Vol. 4, № 1. – P. 23-32.
186. Khechinashvili, N.N. Calorimetric investigation of lysozyme thermal denaturation / N.N. Khechinashvili, P.L. Privalov, E.I. Tiktopulo // *FEBS Lett.* – 1973. – Vol. 30, № 1. – P. 57-60.
187. Santos, M.B. Heteroprotein complex formation of bovine serum albumin and lysozyme: Structure and thermal stability / M.B. Santos, C.W.P. de Carvalho, E.E. Garcia-Rojas // *Food Hydrocoll.* – 2018. – Vol. 74. – P. 267-274.
188. Blumlein, A. Reversible and non-reversible thermal denaturation of lysozyme with varying pH at low ionic strength / A. Blumlein, J.J. McManus // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* – 2013. – Vol. 1834, № 10. – P. 2064-2070.
189. Magsumov, T. The effect of dimethyl sulfoxide on the lysozyme unfolding kinetics, thermodynamics, and mechanism / T. Magsumov, A. Fatkhutdinova, T. Mukhametzyanov, I. Sedov // *Biomolecules.* MDPI – 2019. – Vol. 9, № 10. – P. 1-16.
190. Wu, S. Mechanic Insight into Aggregation of Lysozyme by Ultrasensitive Differential Scanning Calorimetry and Sedimentation Velocity / S. Wu, Y. Ding, G. Zhang // *J Phys Chem B.* – 2015. – Vol. 119, № 52. – P. 15789-15795.

191. Schön, A. Temperature stability of proteins: Analysis of irreversible denaturation using isothermal calorimetry / A. Schön, B.R. Clarkson, M. Jaime, E. Freire // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2017. – Vol. 85, № 11. – P. 2009-2016.
192. Singh, S. Effect of polyols on the conformational stability and biological activity of a model protein lysozyme / S. Singh, J. Singh // *AAPS PharmSciTech*. – 2003. – Vol. 4, № 3. – P. 101-109.
193. Sirotkin, V.A. Volume changes associated with guanidine hydrochloride, temperature, and ethanol induced unfolding of lysozyme / V.A. Sirotkin, R. Winter // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Vol. 114, № 50. – P. 16881-16886.
194. Wang, B. Temperature-modulated differential scanning calorimetry in a MEMS device / B. Wang, Q. Lin // *Sens Actuators B Chem*. – 2013. – Vol. 180. – P. 60-65.
195. Kamiyama, T. Preferential solvation of lysozyme by dimethyl sulfoxide in binary solutions of water and dimethyl sulfoxide / T. Kamiyama, H.L. Liu, T. Kimura // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2009. – Vol. 95, № 2. – P. 353-359.
196. Cao, X.M. Effects of protein and phosphate buffer concentrations on thermal denaturation of lysozyme analyzed by isoconversional method / X.M. Cao, Y. Tianb, Z.Y. Wang, Y.W. Liu, C.X. Wang // *Bioengineered*. – 2016. – Vol. 7, № 4. – P. 235-240.
197. Raccosta, S. Irreversible gelation of thermally unfolded proteins: structural and mechanical properties of lysozyme aggregates / S. Raccosta, M. Manno, D. Bulone, D. Giacomazza, V. Militello, V. Martorana, P.L.S. Biagio // *European Biophysics Journal*. – 2010. – Vol. 39, № 6. – P. 1007-1017.
198. Determination of Folding Reversibility of Lysozyme Crystals Using Microcalorimetry / Elkordy A., Forbes T., Barry W. // *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry* / edited by A. Elkordy: InTechOpen. – 2013. – Chapter 8, P. 185-196.
199. Armarego, W.L.F. *Purification of laboratory chemicals*. 8th ed. – 2017. – P. 1198.
200. Pace, C.N. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein / C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray // *Protein Science*. – 1995. – Vol. 4, № 11. – P. 2411-2423.
201. Sedov, I.A. A procedure for calibration of differential scanning calorimeters / I.A. Sedov, T.A. Muhametzyanov, B.N. Solomonov // *Thermochim Acta*. – 2016. – Vol. 639. – P. 10-13.
202. Van Herwaarden, S. Design, performance and analysis of thermal lag of the UFS1 twin-calorimeter chip for fast scanning calorimetry using the Mettler-Toledo Flash DSC 1 / S. van Herwaarden, E. Iervolino, F. van Herwaarden, T. Wijffels, A. Leenaers, V. Mathot // *Thermochim Acta*. – 2011. – Vol. 522, № 1-2. – P. 46-52.
203. Baker, B.R. g-Factor analysis of protein secondary structure in solutions and thin films / B.R. Baker, R.L. Garrell // *Faraday Discuss*. – 2004. – Vol. 126. – P. 209-222.

204. Robinson, N.E. Protein deamidation / N.E. Robinson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99, № 8. – P. 5283-5288.
205. Stratton, L.P. Controlling deamidation rates in a model peptide: Effects of temperature, peptide concentration, and additives / L.P. Stratton, R.M. Kelly, J. Rowe, J.E. Shively, D.D. Smith, J.F. Carpenter, M.C. Manning // *J Pharm Sci*. – 2001. – Vol. 90, № 12. – P. 2141-2148.
206. Pace, A.L. Asparagine Deamidation Dependence on Buffer Type, pH, and Temperature / A.L. Pace, R.L. Wong, Y.T. Zhang, Y.-H. Kao, Y.J. Wang // *J Pharm Sci*. – 2013. – Vol. 102, № 6. – P. 1712-1723.
207. Tomizawa, H. Stabilization of lysozyme against irreversible inactivation by suppression of chemical reactions / H. Tomizawa, H. Yamada, K. Wada, T. Imoto // *J Biochem*. – 1995. – Vol. 117, № 3. – P. 635-640.
208. Catak, S. Reaction Mechanism of Deamidation of Asparaginyl Residues in Peptides: Effect of Solvent Molecules / S.Catak, G. Monard, V. Aviyente, M.F. Ruiz-López // *J Phys Chem A*. – 2006. – Vol. 110, № 27. – P. 8354-8365.
209. Mukhametzyanov, T.A. Calorimetric observation of lysozyme degradation at elevated temperature in water and DMSO-water mixtures / T.A. Mukhametzyanov, A.A. Fatkhutdinova., I.A. Sedov, L.S. Yakimova, A.E. Klimovitskii // *Thermochimica Acta* – 2021 – Vol. 695 – 178826 – pp. 1-9
210. Rariy, R.V. Correct protein folding in glycerol / R.V. Rariy, A.M. Klibanov // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1997. – Vol. 94, № 25. – P. 13520-13523.
211. Muttathukattil, A.N. Role of Disulfide Bonds and Topological Frustration in the Kinetic Partitioning of Lysozyme Folding Pathways / A.N. Muttathukattil, P.C. Singh, G. Reddy // *J Phys Chem B*. – 2019. – Vol. 123, № 15. – P. 3232-3241.
212. Miles, C.A. Kinetics of collagen denaturation in mammalian lens capsules studied by differential scanning calorimetry / C.A. Miles // *Int J Biol Macromol*. – 1993. – Vol. 15, № 5. – P. 265-271.
213. Meng, F.-G. Osmophobic effect of glycerol on irreversible thermal denaturation of rabbit creatine kinase / F.-G. Meng, Y.-K. Hong, H.-W. He, A.E. Lyubarev, B.I. Kurganov, Y.-B. Yan, H.-M. Zhou // *Biophys J*. – 2004. – Vol. 87, № 4. – P. 2247-2254.
214. Chen, X. Insight into the effect of glycerol on stability of globular proteins in high protein model system / X. Chen, B. Bhandari, P. Zhou // *Food Chem*. – 2019. – Vol. 278. – P. 780-785.
215. Esposito, A. Influence of Glycerol on the Structure and Thermal Stability of Lysozyme: A Dynamic Light Scattering and Circular Dichroism Study / A. Esposito, L. Comez, S. Cinelli, F. Scarponi, G. Onori // *J Phys Chem B*. – 2009. – Vol. 113, № 51. – P. 16420–16424.
216. Kiefhaber, T. Kinetic traps in lysozyme folding / T. Kiefhaber // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92, № 20. – P. 9029-9033.
217. Fatkhutdinova, A.A. Refolding of lysozyme in glycerol as studied by fast scanning calorimetry / A.A. Fatkhutdinova, T.A. Mukhametzyanov, C. Schick // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022 – Vol. 23, №2773 – pp. 1-13.

218. Höhne, G.W.H. Calibration of magnitude and phase angle of TMDSC Part1: basic considerations. / G.W.H. Höhne, M. Merzlyakov, C. Schick // *Thermochimica acta* – 2002. – Vol. 391 – P. 51-67.
219. Merzlyakov, M. Calibration of magnitude and phase angle of TMDSC Part 2. Calibration practice / M. Merzlyakov, G.W.H. Höhne, C. Schick // *Thermochimica acta* – 2002. – Vol. 391 – P. 69-80.
220. Lepock, J.R. Influence of transition rates and scan rate on kinetic simulations of differential scanning calorimetry profiles of reversible and irreversible protein denaturation // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31, № 50. – P. 12706-12712.
221. Mukhametzyanov, T.A. Step-scan calorimetry of protein denaturation: modeling and experiment / T.A. Mukhametzyanov, A.A. Fatkhutdinova, C. Schick // *Thermochimica Acta* – 2022 – Vol. 710, 179181 – pp. 1-14
222. Romero-Romero, M.L. Highly anomalous energetics of protein cold denaturation linked to Folding-Unfolding kinetics / M.L. Romero-Romero, A. Inglés-Prieto, B. Ibarra-Molero, J.M. Sanchez-Ruiz // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 7. – P. 1-7.