



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Mikrokalorymetryczne badania przemian konformacyjnych albuminy poddanej działaniu wybranych czynników fizykochemicznych

Author: Anna Michnik

Citation style: Michnik Anna. (2009). Mikrokalorymetryczne badania przemian konformacyjnych albuminy poddanej działaniu wybranych czynników fizykochemicznych. Katowice : Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego.



Uznanie autorstwa - Użycie niekomercyjne - Bez utworów zależnych Polska - Licencja ta zezwala na rozpowszechnianie, przedstawianie i wykonywanie utworu jedynie w celach niekomercyjnych oraz pod warunkiem zachowania go w oryginalnej postaci (nie tworzenia utworów zależnych).



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



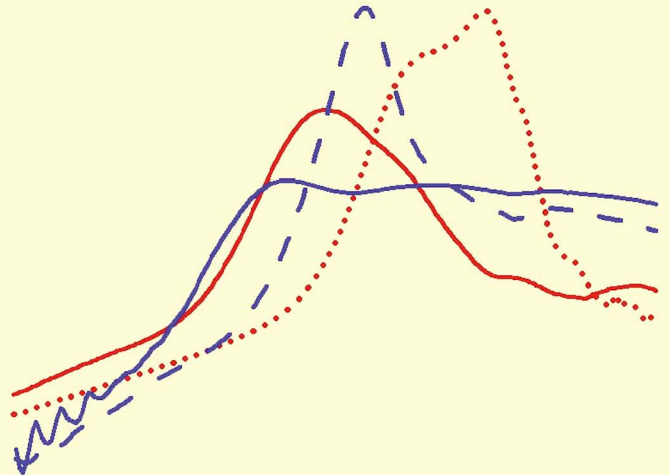
Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Anna Michnik

Mikrokalorymetryczne badania przemian konformacyjnych albuminy poddanej działaniu wybranych czynników fizykochemicznych



**Mikrokalorymetryczne badania
przemian konformacyjnych albuminy
poddanej działaniu
wybranych czynników fizykochemicznych**



NR 2681

Anna Michnik

**Mikrokalorymetryczne badania
przemian konformacyjnych albuminy
poddanej działaniu
wybranych czynników fizykochemicznych**



Redaktor serii: Fizyka
WŁADYSŁAW BORGIEŁ

Recenzenci
ANNA SUŁKOWSKA, LILIANNA TRYNDA-LEMIESZ

Publikacja będzie dostępna — po wyczerpaniu nakładu — w wersji internetowej:

Śląska Biblioteka Cyfrowa
www.sbc.org.pl

Spis treści

Wprowadzenie	7
1. Białka: konformacja, pojemność cieplna	13
1.1. Stan konformacyjny białka	13
1.2. Pojemność cieplna białek	15
2. Albumina — struktura i funkcje	20
3. Badania DSC białek	24
3.1. Termiczne rozfałdowanie białka	24
3.2. Aspekty kinetyczne w procesie denaturacji białek — model Lumry— Eyringa	31
4. Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC	35
4.1. Podstawy analizy dekonwolucyjnej	35
4.2. Przejścia niezależne	37
4.2.1. Model niezależnych przejść dwustanowych, uwzględniający efek- ty ΔC_p	39
4.2.2. Model niezależnych przejść dwustanowych, z wykluczeniem efek- tów ΔC_p	40
4.2.3. Model niezależnych przejść niedwustanowych	40
4.3. Przejścia sekwencyjne	41
4.4. Pojedyncze przejście dwustanowe z dysocjacją podjednostek	42
5. Proces termicznej denaturacji albuminy w roztworach wodnych	44
5.1. Charakterystyka DSC termicznej przemiany pomiędzy stanem natywnym i zdenaturowanym albuminy.	44

5.2. Specyfika termicznych przemian konformacyjnych albuminy ludzkiej i wołowej	48
5.3. Wpływ obecności kwasów tłuszczowych na charakter termicznego rozfałdowania albuminy	52
5.4. Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC albuminy	54
6. Termiczna denaturacja albuminy surowicy w roztworach wodnych modyfikowanych wybranymi czynnikami chemicznymi	63
6.1. Przemiany BSA w roztworach o pH w zakresie 3,5—7,0	63
6.2. Proces termicznej denaturacji HSA i HSAf w roztworach wodnych etanolu	71
6.2.1. Białka w roztworach wodno-alkoholowych	71
6.2.2. Proces termicznej denaturacji HSA i HSAf w obecności etanolu	73
6.2.3. Wiązanie etanolu do albuminy	75
6.2.4. Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC albuminy w roztworach etanol-woda	79
7. Skutki ekspozycji roztworów wodnych albuminy na wybrane zakresy promieniowania elektromagnetycznego	84
7.1. Wpływ promieniowania o częstości radiowej na trwałość konformacji albuminy wołowej.	84
7.2. Konformacyjna reorganizacja albuminy pod wpływem promieniowania UV	92
Podsumowanie	105
Dodatek	109
D I. Wiązanie kwasów tłuszczowych do albuminy	109
D II. Siły stabilizujące strukturę białka	111
D III. Wpływ środowiska na konformacyjną stabilność makromolekuły białka	114
D IV. Pomiar kalorymetryczne i spektrofotometryczne	119
D V. Analiza statystyczna wyników.	120
Literatura	121
Summary	139
Zusammenfassung.	141

Wprowadzenie

Inspiracją do badań przemian konformacyjnych białek zachodzących pod wpływem czynników fizykochemicznych jest wiele niewyjaśnionych w pełni kwestii dotyczących zależności pomiędzy zmianą natywnej struktury białek w wyniku oddziaływania ze środowiskiem a skutkami, jakie te modyfikacje niosą dla organizmów żywych. Narażenie środowiskowe jest zazwyczaj narażeniem mieszanym na wiele czynników o różnych stężeniach bądź natężeniach. Efekt końcowy jednoczesnego działania wielu czynników zależy od interakcji między nimi, a w przypadku organizmów żywych także od ich indywidualnych reakcji i odpowiedzi na bodźce środowiskowe. Prowadzenie badań *in vitro*, mających na celu poznanie wpływu każdego z czynników oddzielnie lub ich ograniczonej kombinacji nie na obiekty żywe, lecz na ich wyodrębnione składniki, nie jest w stanie zastąpić badań *in vivo*. Jedną z wielu przyczyn jest trudność wiernego odtworzenia warunków fizjologicznych, na przykład tzw. załoczenia molekularnego panującego w komórce, od którego w bardzo istotny sposób uzależnione są konformacje makromolekuł, aktywność enzymów i szybkość reakcji biochemicznych (MINTON, 2001, 2005; ELLIS, 2001; CHEBOTAREVA *et al.*, 2004). Na obecnym etapie wiedzy selektywne badania modelowe, mimo określonych założeń upraszczających, nadal wnoszą istotny wkład w poznanie i zrozumienie zjawisk fizycznych leżących u podłoża procesów, wywołujących określone skutki w danych warunkach środowiskowych.

Białka, podstawowe składniki każdej komórki, biorą udział w licznych procesach fizjologicznych: przenoszeniu i magazynowaniu różnych substancji, utlenianiu tkankowym, krzepnięciu krwi, procesach odpornościowych, procesach widzenia, przewodzeniu bodźców nerwowych, skurczu mięśni, dostarczaniu energii, regulacji procesów metabolicznych — stężenia jonów, ciśnienia osmotycznego. Wszystkie te funkcje wypełniają one dzięki odwracalnym zmianom specyficznej struktury przestrzennej każdego z nich.

Zdobycie wszechstronnych informacji na temat trwałości struktur białkowych jest ważne w aspekcie współczesnych badań farmaceutycznych. W ostatnich latach powstaje wiele nowych leków na bazie białek, przy czym największym problemem jest zwykle mała trwałość tych farmaceutyków. Dodatkowo procesy technologiczne prowadzące do ostatecznej formy bezpiecznego i skutecznego (aktywnego) preparatu, składają się z procedur, które mogą modyfikować białko w niepożądany sposób. Wyściowy materiał poddawany jest np. działaniu promieniowania jonizującego, UV (254 nm) czy termicznej sterylizacji w celu zniszczenia bakterii i wirusów. Te działania nie pozostają prawdopodobnie bez wpływu na strukturę i właściwości makromolekuł.

Albumina jest to białko surowicy krwi, które obficie występuje w organizmach ssaków. Pomimo tego że zarówno struktura, jak i podstawowe funkcje albuminy zostały stosunkowo dobrze poznane, nie przestaje ona być obiektem wszechstronnych badań naukowych. Wybrane, zdaniem autorki ważne w kontekście pracy, informacje na temat tego białka przedstawiono w rozdziale 2. Poznanie wpływu różnych czynników fizykochemicznych na właściwości albuminy przyczynia się do zrozumienia zaburzeń jej funkcji. Termiczne charakterystyki albuminy dostarczają cennych wskazówek w kontekście jej zastosowań praktycznych, np. w laserowym zespalaniu tkanek (BLEUSTEIN *et al.*, 2000 a, b), metodzie alternatywnej do zszywania chirurgicznego. Albuminy używa się jako „lutu” w celu poprawy konsystencji i zwiększenia wytrzymałości blizny. Termiczna pasteryzacja roztworów albuminy poprzedza ich zastosowania kliniczne (przeprowadza się ją ze względu na możliwość obecności wirusów, np. HIV, opryszczki, zapalenia wątroby).

Badania termicznej denaturacji albuminy dostarczają ważnych informacji na temat wewnątrz- i międzydomenowych oddziaływań istotnych dla stabilizacji aktywnej formy białka. Zachowanie się albuminy pod wpływem temperatury badano różnymi metodami, a najczęściej techniką dichroizmu kołowego (CD) (TAKEDA *et al.*, 1989; ARAKAWA *et al.*, 2000; WATANABE *et al.*, 2001; KRAGH-HANSEN *et al.*, 2005) i różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) (ANRAKU *et al.*, 2007; BARONE *et al.*, 1995; FARRUGGIA, PICÓ, 1999; GIANCOLA *et al.*, 1997; MICHNIK, 2003; ROSS, SHRAKE, 1988; TIKTOPULO *et al.*, 1985; YAMASAKI *et al.*, 1990, 1991, 1992).

Nowoczesna aparatura pozwala na badanie zmian zachodzących w strukturze białek na poziomie molekularnym. Uchwycenie tych zmian i powiązanie ich z funkcjami białek wzbogaca wiedzę dotyczącą prawidłowości funkcjonowania naszych organizmów, a także podłoża niektórych chorób. Zaburzenia konformacyjne białek leżą u podstaw takich chorób układu pozapiramidowego jak: choroba Parkinsona, otępienie, z ciałami Lewy’ego (ang. *Dementia with Lewy bodies* — DLB), postępujące porażenie nadjądrowe. Nieprawidłowa struktura białek ma także związek z chorobą Alzheimera i chorobą prionową BSE.

Relacje między strukturą a funkcją białek zależą silnie od oddziaływań z rozpuszczalnikiem. Problem ten jest szeroko badany od wielu lat i mimo to wciąż żywo dyskutowany. Ponieważ większość białek funkcjonuje w roztworach wodnych, znaczenie wody i zrozumienie różnych aspektów oddziaływań w środowisku wodnym jest szczególnie ważne. Aktywność białka oraz jego konformacyjna elastyczność są w dużym stopniu uwarunkowane obecnością wody. Struktura natywnych białek jest określona przez równowagę wewnątrz- i międzymolekularnych oddziaływań pomiędzy różnymi resztami aminokwasowymi oraz tymi resztami i molekułami wody otaczającymi białka. Ta równowaga określa tendencję poszczególnych reszt aminokwasowych do preferowania wnętrza lub powierzchni białka. Może być zmieniona np. przez denaturanty czy stabilizatory obecne w roztworze, jak również przez zmiany temperatury, ciśnienia, pH czy siły jonowej. Ogólna struktura białek jest wtedy osłabiana lub wzmacniana, zależnie od właściwości molekuł. Badanie tych zmian dostarcza wartościowej informacji na temat roli rozpuszczalnika w utrzymaniu konformacji natywnego białka. Krótkie omówienie oddziaływań istotnych dla stabilizacji struktury białka oraz czynników modyfikujących ją zawarto w rozdziałach D II i D III *Dodatku*.

Od dawna bada się wpływ podstawowych czynników fizycznych: temperatury i ciśnienia, na trwałość struktur białkowych. Paradoksalnie, śledzenie procesu denaturacji, a więc niszczenia struktury białka, pozwala lepiej poznać i zrozumieć oddziaływania kluczowe w procesie fałdowania białka do specyficznej dla niego konformacji oraz istotne dla stabilizacji tej struktury. Większość zagadnień dyskutowanych w tej pracy skupia się wokół termicznej denaturacji białek, a pewne aspekty denaturacji ciśnieniowej przedyskutowano w rozdziale D III *Dodatku*.

Konformacja białka może być również zmieniana pod wpływem innych czynników fizycznych, np. jonizującego promieniowania gamma (SZWEDA-LEWANDOWSKA *et al.*, 1976; FESSAS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2000; LEE, SONG, 2002; CHO, SONG, 2000; CIEŚLA *et al.*, 2000). Autorzy niektórych prac zwracają uwagę, że także podczas badań krystalograficznych struktury białek promieniami X ulega ona zmianie, co powoduje różnice pomiędzy strukturami: natywną i stwierdzoną na podstawie eksperymentu dyfrakcyjnego (NAVE, 1995; CARUGO, CARUGO, 2005).

Wyniki badań mikrokalorymetrycznych prezentowane w tej pracy wykazały, że także promieniowanie elektromagnetyczne niejonizujące z zakresu UV oraz radiowego prowadzi do strukturalnych modyfikacji jednego z głównych białek osocza — albuminy (MICHNIK *et al.*, 2004 a, b, 2008).

Pomiar kalorymetryczny umożliwia bezpośrednie wyznaczenie makroskopowej wielkości termodynamicznej — entalpii badanego procesu. Ze względu na kompensację entalpowo-entropową sama wartość zmian energii swobodnej Gibbsa (entalpii swobodnej), miary konformacyjnej stabilności białka nie jest

wystarczająca do prawidłowego opisu termodynamiki przemiany. Znaczące udoskonalenie aparatury kalorymetrycznej oraz pojawienie się komercyjnie dostępnych kalorymetrów o wysokiej czułości, np. różnicowych kalorymetrów skaningowych DSC, charakteryzujących się czułością ułamka mikrowata, przyczyniło się do zastosowania metod kalorymetrycznych w badaniach przemian zachodzących w białkach pod wpływem temperatury. Dobrej jakości mikrokalorymetry umożliwiają detekcję nawet stosunkowo słabych, subtelnych zmian wywoływanych w energetyce tych przemian różnorodnymi czynnikami. Mikrokalorymetr VP DSC (MicroCal Co.), stosowany w badaniach, których wyniki prezentowane są w tej pracy, należy do klasy takich wysokoczulych kalorymetrów, przeznaczonych do badania próbek w stanie ciekłym i w szczególności bardzo dobrze nadaje się do badania roztworów białek.

Obecnie zgromadzono pokaźny materiał doświadczalny dotyczący badań termicznej denaturacji białek metodą DSC. Złożoność obserwowanych przemian, ich zależność od specyfiki badanych struktur białkowych, jak i wielu czynników doświadczalnych stanowi o atrakcyjności problematyki, a jednocześnie utrudnia porównywanie wyników uzyskiwanych przez różnych autorów. W niniejszym opracowaniu ograniczono się do zaprezentowania i przedyskutowania na podstawie dostępnych danych literaturowych zagadnień dotyczących termicznych przemian albuminy. Wiele z zawartych treści ma jednak uniwersalny charakter i ilustruje różnorodność oraz specyfikę problemów związanych z analizą procesów przebiegających w roztworach białek pod wpływem wzrostu temperatury.

Termiczne rozfałdowanie białka uważa się za przejście globalne, co oznacza, że procesowi temu w określonych warunkach ulega całość, a nie polega ono na stopniowym osłabieniu struktury ze wzrostem temperatury (JACKSON, 2006). Dla małych białek globularnych proces ich termicznej denaturacji może być często rozpatrywany jako dwustanowy, na co wskazuje zgodność entalpii kalorymetrycznej i van't Hoffa (PRIVALOV, 1979), tzn. że w temperaturach bliskich przejściu współistnieją dwa stany: natywne i rozfałdowane. W przypadku większych białek, wielodomenowych lub złożonych z kilku podjednostek, opis procesu staje się bardziej skomplikowany. Jeśli wszystkie podjednostki ulegają rozfałdowaniu równocześnie, przejście nazywane jest kooperatywnym. Kooperatywnemu rozfałdowaniu białka złożonego z n identycznych podjednostek towarzyszy efektywna zmiana entalpii na mol n -meru, czyli entalpia van't Hoffa n razy większa od entalpii rozfałdowania pojedynczej podjednostki. Entalpia van't Hoffa określa stromość przejścia: im większa kooperatywność, tym większa efektywna entalpia i przejście bardziej strome. Porównanie entalpii kalorymetrycznej i van't Hoffa dostarcza informacji na temat liczby kooperatywnych podjednostek ujawniających się podczas przejścia. Denaturację niektórych dużych białek można opisać jako sumę procesów denaturacji ich składowych domen.

Połączenie danych kalorymetrycznych z odpowiednim modelem teoretycznym pozwala uzyskać informacje na poziomie molekularnym. Celem autorki tej pracy było zaadaptowanie dostępnych modeli analizy dekonwolucyjnej danych kalorymetrycznych, opisanych w rozdziale 4, do opisu przemian konformacyjnych zachodzących w cząsteczce albuminy. Śledząc doniesienia literaturowe, można się dopatrzeć stosowania uproszczeń interpretacyjnych i niezgodności między modelami proponowanymi do opisu procesu termicznego rozfałdowania albuminy. Zostało to uwzględnione w dyskusji zagadnień przeanalizowanych w niniejszej pracy.

Ważnym celem podjętych prac badawczych było wykazanie różnic w przebiegu procesu termicznego rozfałdowania albuminy pozbawionej kwasów tłuszczowych oraz nieodtłuszczonej. Problem przyłączania kwasów tłuszczowych do albuminy był w ostatnich latach szeroko badany, co zrelacjonowano krótko w rozdziale D I *Dodatku*. Konsekwencje dowiedzionych zmian konformacyjnych albuminy, związanych z przyłączeniem kwasów tłuszczowych (CURRY *et al.*, 1998; SUGIO *et al.*, 1999; BHATTACHARYA *et al.*, 2000), nie zostały jeszcze dostatecznie poznane. W bieżącej pracy dużo uwagi poświęcono dyskusji na temat odmiennych reakcji obydwu form albuminy na działanie stosowanych czynników fizykochemicznych. Na osiągnięcie tego celu złożyło się kilka pośrednich zadań badawczych: charakterystyka termicznego rozfałdowania albuminy odtłuszczonej i zawierającej kwasy tłuszczowe w roztworach wodnych oraz w roztworach etanolu, zbadanie różnic w wiązaniu etanolu oraz porównanie wpływu promieniowania UV na różniące się zawartością kwasów tłuszczowych formy albuminy.

Aby uwiarygodnić wnioski płynące z porównania wyznaczonych parametrów termodynamicznych oraz obserwowanych tendencji ich zmian, przeprowadzono analizę statystyczną prezentowanych wyników w programie STATISTICA 7.0 (*Dodatek D V*).

1. Białka: konformacja, pojemność cieplna

1.1. Stan konformacyjny białka

Natywna struktura białka reprezentuje równowagę energetyczną różnego typu oddziaływań między grupami (fragmentami) makromolekuły oraz między tymi grupami i otaczającym środowiskiem, zwykle wodą. Forma natywna białka ma konformację najbardziej stabilną energetycznie. Należy zdawać sobie sprawę z tego, że opisanie stanu natywnego jako posiadającego jedną konformację jest uproszczeniem. Bardziej realistyczne wyobrażenie tego stanu to zestaw (klaster) strukturalnie podobnych konformacji lub stan globalny, mieszczący w sobie małą, ale znaczącą liczbę mikrostanów.

Opisując stan konformacyjny białka w języku mechaniki statystycznej, można założyć, że mikrostan ma konformację, która jest zdefiniowana z dużymi szczegółami, tzn. że mogą być znane pozycje wszystkich atomów makromolekuły i kąty wszystkich rotujących wiązań. Mikrostan przekształcają się gwałtownie i stan globalny odzwierciedla średnie zachowanie się tych mikrostanów.

Energię swobodną Gibbsa G (entalpię swobodną) układu zawierającego N niezależnych molekuł można wyrazić jako:

$$G = -kT \ln(Q^N), \quad (1.1)$$

gdzie: Q jest sumą statystyczną (funkcją podziału), kT jest iloczynem stałej Boltzmanna i temperatury. Q jest sumą statystyczną po zbiorze mikrostanów włączonych w jeden stan globalny:

$$Q = \sum_i^{n_{GS}} e^{-E_i/kT}, \quad (1.2)$$

gdzie: E_i jest energią i -tego mikrostanu, a $e^{-E_i/kT}$ jest jego wagą boltzmanowską. Skupiając się na jednym szczególnym stanie globalnym, ograniczymy tę sumę do wybranego podzbioru lub podzespołu mikrostanów, nazwanego GS . Całkowitą liczbę mikrostanów w ramach danego stanu globalnego oznacza n_{GS} . Prawdopodobieństwo znalezienia danego mikrostanu j o energii E_j wśród wszystkich możliwych mikrostanów danego stanu globalnego wynosi:

$$P(j) = \frac{e^{-E_j/kT}}{\sum_i^{n_{GS}} e^{-E_i/kT}}. \quad (1.3)$$

Definicja mikrostanu jest bardzo płynna i może być rozszerzona. Na przykład każdy mikrostan ma entropię wynikającą z nieuporządkowania związanego z efektem wibracji wiązania. Biorąc to pod uwagę, musimy rozszerzyć sumę w równaniu (1.2), tak by zawierała wibracyjne poziomy energii. Dodatkowo, mikrostrany białka mogą być rozróżnialne przez różne pozycje i orientacje otaczających cząsteczek wody i, prawdopodobnie, także jonów w roztworze. Jeśli te wkłady są włączone w równaniu (1.2), to energia swobodna Gibbsa w równaniu (1.1) będzie dokładniejsza.

Alternatywnym sposobem myślenia o funkcji podziału stanu globalnego jest uznanie dyskretnych stanów w równaniu (1.2) za *continuum*. Suma staje się wtedy całką po obszarze wszystkich wewnętrznych współrzędnych molekuly

$$Q = \int_{GS} e^{-E(r)/kT} dr, \quad (1.4)$$

gdzie: \mathbf{r} jest wektorem zawierającym pozycje wszystkich atomów, $E(r)$ zaś jest energią potencjalną molekuly jako funkcji tych położzeń.

Należy zauważyć, że równania (1.2) i (1.4) pomijają wkłady pochodzące od energii kinetycznej. W fizyce klasycznej (gdy nie rozpatrujemy efektów kwantowo-mechanicznych) nie ma to znaczenia, ponieważ każdy atom ma średnią energię kinetyczną $3/2 kT$. Tak samo jest w przypadku wszystkich mikrostanów. Efekty kwantowe są ważne dla silnych wiązań kowalencyjnych. Jednak podczas rozważanych w tej pracy przejść, związanych z termiczną denaturacją białka, wiązania kowalencyjne nie są zrywane.

Aby wyliczyć całkowitą energię potencjalną białka w szczególnej konfiguracji, należy zapisać wkłady od poszczególnych oddziaływań w funkcji pozycji wszystkich atomów:

$$\begin{aligned}
U = & \sum_{\text{wiązania}} a_{\alpha} (x_i - x_{i0})^2 + \sum_{\text{kąty wiązań}} b_{\beta} (\theta_i - \theta_{i0})^2 + \\
& + \sum_{\text{kąty dwuściennne}} c_{\gamma} (1 - \cos(n_i (\phi_i - \phi_{i0})))^2 + \sum_{\text{ładunki}} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r) r_{ij}} + \\
& + \sum_{\text{atomy obojętne}} 4d_{\delta} \left(\left(\frac{r_{ij0}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_{ij0}}{r_{ij}} \right)^6 \right).
\end{aligned} \tag{1.5}$$

Pierwszy człon reprezentuje energię rozciągania wszystkich kowalencyjnych wiązań w białku; a_{α} są stałymi siłowymi dla wiązań, x_{i0} jest długością wiązania, dla którego energia rozciągania osiąga minimum. Drugi człon reprezentuje energię zginania wszystkich wiązań, a b_{β} i θ_{i0} mają znaczenie analogiczne do odpowiednich parametrów z pierwszej sumy. Trzeci człon reprezentuje potencjały rotacyjne kątów dwuściennych z parametrami zdefiniowanymi jak w dwóch pierwszych sumach. Czwarta suma jest dla oddziaływań elektrostatycznych ze stałą dielektryczną ε , która zależy od pozycji w białku. Piąty człon reprezentuje niewiążące oddziaływania opisane potencjałem Lenarda—Jonesa.

Teoretycznie zatem można znaleźć strukturę stanu natywnego, minimalizując energię potencjalną, która jest wyrażona wzorem (1.5). Różnica energii między dwoma różnymi minimami lokalnymi określa względną stabilność dwóch stanów globalnych. Poważnym problemem jest jednak długi czas obliczeń, który rośnie eksponencjalnie z rozmiarem molekuly. Nawet dla małych białek zadanie to jest niewykonalne z wykorzystaniem dostępnych obecnie komputerów (JACKSON, 2006).

Innym problemem jest ograniczona dokładność każdego z członów funkcji energii potencjalnej. Trudno jest np. wyliczyć dokładnie człony elektrostatyczne, ponieważ stała dielektryczna zależy od pozycji i rzadko jest znana z lepszą dokładnością niż 2. Słabo zrozumiałe są środowiskowe zależności innych oddziaływań. Ostatecznie, błąd może być większy niż różnice energii pomiędzy wieloma minimami lokalnymi w tej funkcji energii potencjalnej.

1.2. Pojemność cieplna białek

Pojemność cieplna wyraża się stosunkiem ilości ciepła pobranego przez ciało do wywołanej w wyniku tego zmiany temperatury. W warunkach izobarycznych można ją wyznaczyć z temperaturowych zmian entalpii H :

$$C_p = \frac{dH}{dT}. \quad (1.6)$$

Doświadczalnie właściwa pojemność cieplna jest energią cieplną, ΔQ , wymaganą do spowodowania wzrostu temperatury jednostkowej masy substancji o 1 K. Zgodnie z zaleceniami IUPAC, jest ona wyrażana w $JK^{-1}g^{-1}$, natomiast molowa pojemność cieplna jest wyrażona w $JK^{-1}mol^{-1}$. Inne powszechnie używane na określenie pojemności cieplnej wyrażenia to:

$$C_p = T \frac{dS}{dT} = -T^2 \frac{d^2G}{dT^2} = \frac{\langle \delta H^2 \rangle}{kT^2} = \frac{\langle \delta S^2 \rangle}{k}, \quad (1.7)$$

gdzie: S — entropia, G — energia swobodna Gibbsa, $\langle \delta X^2 \rangle$ — średni kwadrat fluktuacji wielkości X . Analogiczne równania można napisać dla ΔC_p , podstawiając zamiast H , S i G ich zmiany, czyli ΔH , ΔS , ΔG .

Całkowita pojemność cieplna, C_p , roztworu przy stałym ciśnieniu, p , może być wyrażona przez pozorną pojemność cieplną, C_{p,Φ_i} , oraz stężenie w_i każdego z N składników następująco:

$$C_p = \sum_{i=1}^N C_{p,\Phi_i} \cdot w_i. \quad (1.8)$$

Pozorna pojemność cieplna i -tego składnika, C_{p,Φ_i} , jest zdefiniowana jako zmiana całkowitej pojemności cieplnej na jednostkę masy przy dodaniu skończonej ilości składnika i w stałej temperaturze i przy stałych stężeniach wszystkich pozostałych składników w_j :

$$C_{p,\Phi_i} = \left(\frac{\partial C_p}{\partial w_i} \right)_{T, w_j} \quad (i \neq j). \quad (1.9)$$

Można ją uzyskać przez pomiar pojemności cieplnej serii roztworów, w których tylko stężenie i -tego składnika jest zmienione. Zarówno pojemności cieplne roztworów, jak i rozpuszczalnika wykreśla się względem w_i . Nachylenie linii prostej między pojemnościami cieplnymi rozpuszczalnika i roztworu odpowiada wtedy pozornej pojemności cieplnej i -tego składnika. Wartość graniczna przy $w_i \rightarrow 0$ jest uznawana za cząstkową pojemność cieplną C_{p,Φ_i}^0 składnika i :

$$C_{p,\Phi_i}^0 = \lim_{w_i \rightarrow 0} C_{p,\Phi_i} = \lim_{w_i \rightarrow 0} \left(\frac{\partial C_p}{\partial w_i} \right)_{T, w_j}. \quad (1.10)$$

W konsekwencji pozorna pojemność cieplna przy danym stężeniu substancji rozpuszczonej, w_i , i cząstkowa pojemność cieplna są powiązane równaniem:

$$C_{p,\Phi_i} = C_{p,\Phi_i}^0 + \frac{\partial C_{p,\Phi_i}}{\partial w_i} \cdot w_i. \quad (1.11)$$

Przy niskich stężeniach (rzędu 10^{-2} — 10^{-3} M) człon $\frac{\partial C_{p,\Phi_i}}{\partial w_i} \cdot w_i$ jest bliski zeru, a pozorna i cząstkowa pojemność cieplna mają taką samą wartość (MAKHATADZE, 1998).

Prowadząc badania temperaturowych zmian pojemności cieplnej białka w roztworze w celu wyznaczenia cząstkowej właściwej pojemności cieplnej białka $C_{p,b}(T)$, należy uwzględnić również cząstkową właściwą pojemność cieplną rozpuszczalnika $C_{p,solv}(T)$. Mamy (JELESAROV, BOSSHARD, 1999; PRIVALOV, POTEKHIN, 1986; ZIELENKIEWICZ, 2003):

$$C_{p,b}(T) = C_p^{solv} \frac{\bar{v}_b}{\bar{v}_{solv}} + \frac{\Delta C_p^{sol-solv}}{m_b}, \quad (1.12)$$

gdzie: $\Delta C_p^{sol-solv} = \Delta C_p^{sol} - \Delta C_p^{solv}$ jest różnicą pojemności cieplnej między roztworem i rozpuszczalnikiem, \bar{v}_b i \bar{v}_{solv} są cząstkowymi objętościami właściwymi odpowiednio białka i rozpuszczalnika, a m_b jest masą białka.

J.M. STURTEVANT (1977) wyodrębnił sześć możliwych źródeł dużych zmian pojemności cieplnej i entropii obserwowanych dla procesów zachodzących z udziałem białek. Są to:

- efekt hydrofobowy,
- ładunki elektrostatyczne,
- wiązania wodorowe,
- entropia konformacyjna,
- wibracje wewnątrzcząsteczkowe,
- zmiany w równowadze pomiędzy stanami,

przy czym szczególne znaczenie mają efekty konformacyjne, hydrofobowe oraz wibracyjne.

Ogólnie wkłady do zmian C_p przy denaturacji można podzielić na te pochodzące od oddziaływań białko — białko oraz związane z hydratacją:

$$\begin{aligned} \Delta C_p &= \Delta C_p^{\text{białko} - \text{białko}} + \left(\Delta C_p^{\text{białko} - \text{rozpuszczalnik}} + \Delta C_p^{\text{rozpuszczalnik} - \text{rozpuszczalnik}} \right) = \\ &= \Delta C_p^{\text{białko} - \text{białko}} + \Delta C_p^{\text{hydratacji}}. \end{aligned} \quad (1.13)$$

Stwierdzono, że cząstkowa pojemność cieplna białka w stanie zdenaturowanym jest większa niż w stanie natywnym. Zmiany pojemności cieplnej białka spowodowane są przede wszystkim hydratacją polarnych i niepolarnych grup znajdujących się wewnątrz makromolekuły w stanie natywnym, a odsłoniętych na działanie rozpuszczalnika (wody) podczas denaturacji (MAKHATADZE, PRIVALOV,

1995; MAKHATADZE, 1998; PRIVALOV, MAKHATADZE, 1990; DILL, 1990; MURPHY *et al.*, 1990, 1991). Potwierdzono eksperymentalnie poprzez podstawienia odpowiednich aminokwasów, że „zagrzebaniu” grup polarnych i niepolarnych w białku towarzyszą zmiany pojemności cieplnej ΔC_p przeciwnych znaków: ujemna — niepolarnym, dodatnia — polarnym (LOLADZE *et al.*, 2001). Wkłady wszystkich innych czynników, takich jak: wzrost swobody konfiguracyjnej, zniszczenie wiązań wewnętrznych, efekty elektrostatyczne i inne nie przekraczają prawdopodobnie 15% całkowitej zmiany pojemności cieplnej białka przy denaturacji (MAKHATADZE, 1998). Wielkość obydwu członów równania (1.13) i ich udział we wzroście C_p przy rozfałdowaniu białka jest nadal dyskutowany (PRABHU, SHARP, 2005).

P.L. PRIVALOV i G.I. MAKHATADZE (1990, 1995) wykazali, że pojemność cieplną białka w stanie rozfałdowanym ($C_{p,U}$) można wyliczyć z dobrą dokładnością, znając sekwencję aminokwasową. Jeśli wszystkie grupy składowe mają kontakt z wodą, to $C_{p,U}$ można wyliczyć, sumując wkłady od poszczególnych łańcuchów bocznych aminokwasów i szkieletu peptydowego:

$$C_{p,U} = \left(\sum_{i=1}^{20} n_i C_{p,i} \right) + (N_{AA} - 1) \cdot C_{p,bb} + C_{p,NH_2} + C_{p,COOH} \quad (1.14)$$

Indeks i odnosi się do 20 aminokwasów, n_i jest liczbą aminokwasów typu i , $C_{p,i}$ — molową pojemnością cieplną tego typu łańcucha bocznego, N_{AA} — liczbą aminokwasów w białku, $C_{p,bb}$ — pojemnością cieplną jednostki szkieletu peptydowego (-CHCONH-), C_{p,NH_2} — pojemnością cieplną reszt aminowych, $C_{p,COOH}$ — pojemnością cieplną reszt karboksylowych.

Jeśli eksperymentalnie zmierzona wartość pojemności cieplnej białka zdenaturowanego (po sfinalizowaniu przejścia związanego z procesem denaturacji) jest mniejsza niż wyliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej wartość $C_{p,U}$, uzyskujemy informację, iż zdenaturowane białko ma pewną resztową strukturę, tzn. że łańcuch polipeptydowy nie jest całkowicie rozfałdowany (JELESAROV, BOSSHARD, 1999).

Należy pamiętać, że pojemności cieplne: $C_{p,i}$, $C_{p,bb}$, C_{p,NH_2} , $C_{p,COOH}$ są funkcjami temperatury. Nieliniową funkcją temperatury jest $C_{p,U}$, natomiast pojemność cieplna białka w stanie natywnym ($C_{p,N}$) jest liniową funkcją temperatury (w zakresie eksperymentalnym, w którym ponad 99% białka jest w stanie natywnym). W tym zakresie pojemność cieplna stanu natywnego (jeśli znormalizuje się ją, uwzględniając wagę molekuly) jest bardzo podobna do wszystkich białek (LADBURY, CHOWDHRY, 1998). Z powodu krzywizny $C_{p,U}$ i liniowości $C_{p,N}$ wartość ΔC_p maleje w wyższych temperaturach, ale jest to efekt niewielki. W celach praktycznych przy wyznaczaniu zmian entalpii w zakresie temperatur 0—80°C zwykle przyjmuje się stałą wartość ΔC_p .

Istnieją semiempiryczne metody wyznaczania ΔC_p . Stwierdzono, że różnica pojemności cieplnej między stanami: rozfałdowanym i natywnym jest wprost proporcjonalna do zmiany w dostępności powierzchni polarnej i niepolarnej (w literaturze anglojęzycznej od *accessible surface area* wprowadzono parametr ASA) na działanie rozpuszczalnika (FREIRE, 1994; MAKHATADZE, PRIVALOV, 1995; LADBURY, CHOWDHRY, 1998)

$$\Delta C_p = \Delta C_{p,ap}^0 \Delta A_{ap} + \Delta C_{p,pol}^0 \Delta A_{pol}, \quad (1.15)$$

gdzie: $\Delta C_{p,ap}^0$ i $\Delta C_{p,pol}^0$ są elementarnymi wkładami: niepolarnym i polarnym (wyrażonymi w $J(K\ mol)^{-1}$ na \AA^2 powierzchni), natomiast ΔA_{ap} , ΔA_{pol} — różnicami między dostępnymi dla rozpuszczalnika powierzchniami niepolarnymi i polarnymi w obydwu stanach.

Praktycznie brak dotychczas modeli fizycznych i metod symulacji stosujących podejście na poziomie atomowym, które pozwoliłyby na wyliczenie wkładów do zmian pojemności cieplnej całej makromolekuły białka (PRABHU, SHARP, 2005).

Zmiana pojemności cieplnej podczas denaturacji białka jest kluczowym parametrem do wyznaczenia termodynamicznej trwałości białek globularnych. Jej wartość określa krzywiznę temperaturowej zależności energii Gibbsa (PRIVALOV, 1979) i stanowi podstawę istnienia zimnej denaturacji danego białka (FRANKS, 1995).

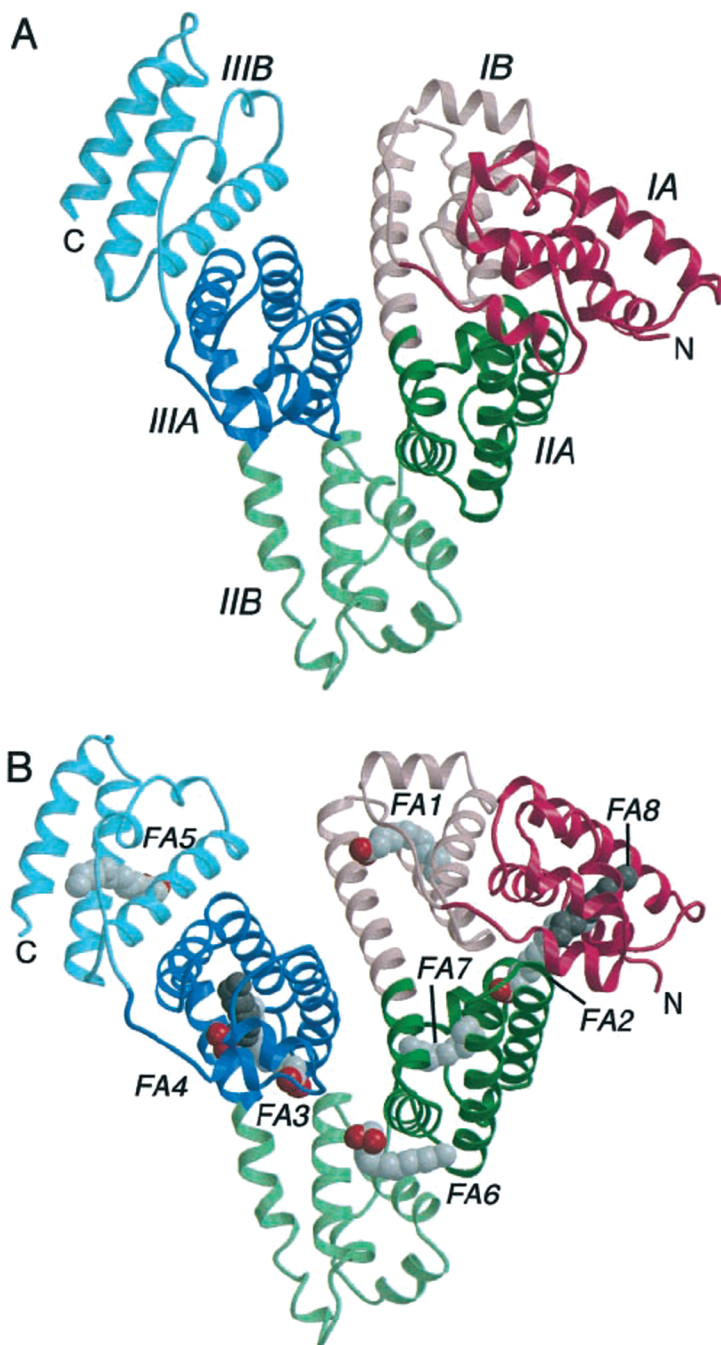
2. Albumina – struktura i funkcje

Albumina stanowi około 60% masy wszystkich białek osocza, typowe jej stężenie w krwiobiegu wynosi ~45 mg/mL. Jest białkiem transportującym endogenne i egzogenne ligandy: kwasy tłuszczowe, bilirubinę, steroidy, hormony, jony, leki i ich metabolity. Działa buforująco na stężenie swobodnych leków, utrzymuje ciśnienie osmotyczne, odgrywa ważną rolę w procesie koagulacji, oczyszcza organizm z endogennych toksyn (PETERS, 1985; CARTER, HO, 1994; KRAGH-HANSEN *et al.*, 2002; SONI, MARGARSON, 2004).

Albumina surowicy krwi ludzkiej (HSA — *human serum albumin*) jest pojedynczym, 66,5 kD monomerycznym polipeptydem zawierającym 585 reszt aminokwasowych i 17 mostków dwusiarczkowych. Ma specyficzny skład aminokwasowy: niską zawartość metioniny (Met), glicyny (Gly), izoleucyny (Ile), a wysoką jonowych reszt kwasu glutaminowego (Glu) i lizyny (Lys), co ułatwia wiązanie anionowych i kationowych ligandów. Obecność tylko jednego tryptofanu Trp (214) umożliwia badania z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych. Około 67% struktury drugorzędowej albuminy stanowi α -helisa, 10% β -zgięcie, brak struktury β -kartki, 23% to rozciągnięty łańcuch.

Badania krystalograficzne HSA, najpierw z rozdzielczością 2,8 Å, a następnie 2,5 Å ujawniły, że albumina ma asymetryczny, sercopodobny kształt (80 Å z boku, średnia grubość 30 Å, objętość 88 249 Å³) (HE, CARTER, 1992; CARTER, HO, 1994; CURRY *et al.*, 1998; SUGIO *et al.*, 1999; BHATTACHARYA *et al.*, 2000). Strukturę albuminy ilustruje rys. 1.

Z hydrodynamicznego punktu widzenia cząsteczka ta może być traktowana jako wydłużona elipsoida obrotowa o półosiach $a = 7,5$ nm i $b = 1,9$ nm, która pokryta jest nierównomiernie dwiema warstwami cząsteczek wody. Warstwa hydratacyjna zwiększa efektywnie długość półosi cząsteczki do $a_h = 8,2$ nm i $b_h = 2,1$ nm, ale pozostawia na prawie niezmiennym poziomie jej stosunek półosi (MONKOS, 2004). Stwierdzono, że konformacja HSA obserwowana w for-



Rys. 1. Struktura HSA i lokalizacja miejsc wiążących kwasy tłuszczowe
 A) natywna struktura HSA, B) struktura HSA po przyłączeniu cząsteczek kwasu tetradekanowego (mirystynowego) (BHATTACHARYA *et al.*, 2000)

mie krystalicznej jest także prawdopodobną konformacją BSA i HSA w roztworze o obojętnym pH (FERRER *et al.*, 2001).

Albumina ma trzy homologiczne α -helikalne domeny, z których każda zawiera 10 helis: 6 tworzy subdomenę A, 4 — subdomenę B. Domeny zostały ponumerowane jako I, II, III, licząc od końca aminowego (rys. 1A). Klasyfikacja strukturalna jest także klasyfikacją funkcjonalną, ponieważ poszczególne domeny odpowiadają za różne własności wiążące.

Pionierskie prace Sudlova (z lat 1975, 1976), z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych, pozwoliły na zidentyfikowanie dwóch miejsc wiążących leki. Zgodnie z nomenklaturą Sudlova, 1. miejsce ulokowane jest w subdomenie IIA, a 2. w subdomenie IIIA. Wyniki wielu badań potwierdziły, że główne obszary wiążące w HSA są ulokowane w hydrofobowych subdomenach IIA i IIIA (HE, CARTER, 1992; HO *et al.*, 1993). Stwierdzono mieszany: elektrostatyczno-hydrofobowy charakter miejsca wiążącego w subdomenie IIA. Dzięki ulokowaniu reaktywnych reszt (swobodnej Cys34, Lys195, Lys199, Tyr411) w subdomenach IIA/IIIA, HSA wiąże różne substraty kowalencyjnie. Subdomena IB uczestniczy w kowalencyjnym wiązaniu ligandów przez His146, Lys137 i Asp187/Glu188. S. CURRY *et al.* (1998) wykazali miejsce wiążące leki (sąsiadujące z miejscem wiążącym kwasy tłuszczowe) w subdomenie IA. GHUMAN *et al.* (2005) przeanalizowali strukturę kompleksów HSA z różnymi lekami. Wykazali, że wiązanie kwasów tłuszczowych powoduje zmianę polarności i objętości miejsca wiążącego 1.

Zebrany bardzo pokaźny materiał doświadczalny na temat wiązania wielu różnych leków do albuminy, charakterystyki miejsc wiążących, efektów kompetycyjnych i ich konsekwencji farmakokinetycznych ma cenne aspekty praktyczne (DOCKAL *et al.*, 1999, 2000 b; KRAGH-HANSEN *et al.*, 1981, 2002; BERTUCCI, DOMENICI, 2002; CUI *et al.*, 2004; BOCEDI *et al.*, 2004; MAHESHA *et al.*, 2006; SUŁKOWSKA *et al.*, 2004—2007; TRYNDA-LEMIESZ, KOZŁOWSKI, 1996; TRYNDA-LEMIESZ *et al.*, 2000, 2004; TRYNDA-LEMIESZ 2004). Kontrowersyjnym, nierozwiązanym problemem pozostaje rozstrzygnięcie, czy miejsca wiążące leki są utworzone wcześniej, czy formują się w trakcie wiązania poszczególnych związków.

Stwierdzono istnienie różnych form izomerycznych albuminy, których występowanie uwarunkowane jest między innymi takimi właściwościami środowiska, jak pH i siła jonowa (PETERS, 1985; CARTER, HO, 1994). Trwają badania nad preparatyką stabilnych w określonych warunkach izoform albuminy w celu dokładnego ich scharakteryzowania w związku z poszukiwaniem odpowiedzi na pytanie, czy pełnią one specyficzne funkcje *in vivo* (GABALDON, 2002). Mogą być także pomocne w wyjaśnieniu anomalnych zachowań pewnych albumin, przejawiających aktywność prokoagulacyjną i prozapalną (FAUCETTE *et al.*, 1992; ZUNIGA *et al.*, 1997).

Molekuła albuminy nie jest statyczna, lecz elastyczna, zmieniająca swój kształt. Dynamiczne własności miejsc wiążących w albuminie były ostatnio ba-

dane (ARTALI *et al.*, 2005) w ramach dynamiki molekularnej z zastosowaniem symulacji z czasem ewolucji 2,0 ns. Analiza fluktuacji reszt aminokwasowych wykazała, że są one największe dla subdomen IIB i IIIB, a najmniejsze dla IIA i IIIA. Jest to zaskakujące, biorąc pod uwagę fakt, że główne obszary wiążące znajdują się w subdomenach IIA i IIIA. W przypadku subdomeny IIA fluktuacje okazały się statystycznie istotne tylko dla α -helis IIA-h1 i IIA-h3. W przypadku subdomeny IIIA tylko α -helisa IIIA-h4 wykazuje zauważalne fluktuacje. Stwierdzono, że główna zmienność łańcucha molekuly albuminy dotyczy obszaru C-końca (okolice subdomeny IIIB), natomiast ruchliwość N-końca (okolice subdomeny IA) jest mniejsza.

3. Badania DSC białek

3.1. Termiczne rozfałdowanie białka

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) jest powszechnie stosowana w badaniach przejść fazowych i zmian konformacyjnych w układach biologicznych: białkach, kwasach nukleinowych, lipidach. W ostatnim dwudziestolecu ukazało się wiele prac przeglądowych poświęconych tej tematyce (STURTEVANT, 1996; PRIVALOV, 1997; PRIVALOV, DRAGAN, 2007; COOPER, 1999; ZIELENKIEWICZ, 2000, 2003), sprecyzowano także wymagania stawiane procedurom prowadzenia pomiarów kalorymetrycznych, kalibracji oraz prezentacji wyników (GMELIN, SARGE, 2000; HINZ, SCHWARZ, 2001; DELLA GATTA *et al.*, 2006). Intensywny rozwój metod kalorymetrycznych spowodował pojawienie się komercyjnie dostępnych, wysokoczułych kalorymetrów, co miało szczególne znaczenie w badaniach białek.

Kalorymetria nie dostarcza informacji o konformacjach przyjmowanych przez molekułę białka. Idea, że sygnał DSC reprezentuje np. termiczne rozfałdowanie białka, powstała dzięki zastosowaniu innych technik. Jednakże kalorymetria pozwala śledzić przejście jednego konformeru w inny, ponieważ związane jest ono ze zniszczeniem licznych słabych sił międzycząsteczkowych, co zapewnia mierzalną zmianę entalpii.

Wielkość różnicy w entalpii między jednym a drugim stanem konformacyjnym określa szybkość, z jaką zachodzą pod wpływem temperatury zmiany między stanami konformacyjnymi. Informuje o tym równanie Gibbsa—Helmholtza:

$$\left(\frac{\partial}{\partial T} \left(\frac{\Delta G_i}{T} \right) \right)_p = - \frac{\Delta H_i}{T^2}. \quad (3.1)$$

Kiedy rośnie temperatura wodnego roztworu białka, pewne molekularne konformacje stają się niekorzystne, ponieważ wzrasta ich energia Gibbsa. Może to być związane z niekorzystnymi wkładami entalpowymi lub entropowymi. Przyjmowane są inne konformacje, które zmniejszają energię Gibbsa układu.

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) umożliwia otrzymywanie danych dotyczących termodynamiki rozfałdowania białek globularnych (GRİKO *et al.*, 1995; PRIVALOV, 1997). Pozwala ona na bezpośrednie wyznaczenie parametrów termodynamicznych określających trwałość termiczną badanych białek, a więc temperatury denaturacji, entalpii, a na tej podstawie entropii oraz energii swobodnej Gibbsa przemian konformacyjnych. Dużą zaletą kalorymetrii jest to, że entalpia i temperatura są skoniugowanymi parametrami termodynamicznymi (ekstensywnym i intensywnym, specyfikującymi układ), których zależność funkcyjna zawiera wszystkie informacje o stanach układu obecnych w rozważanym zakresie temperaturowym (FREIRE, BILTONEN, 1978 a, b; FREIRE, 1994).

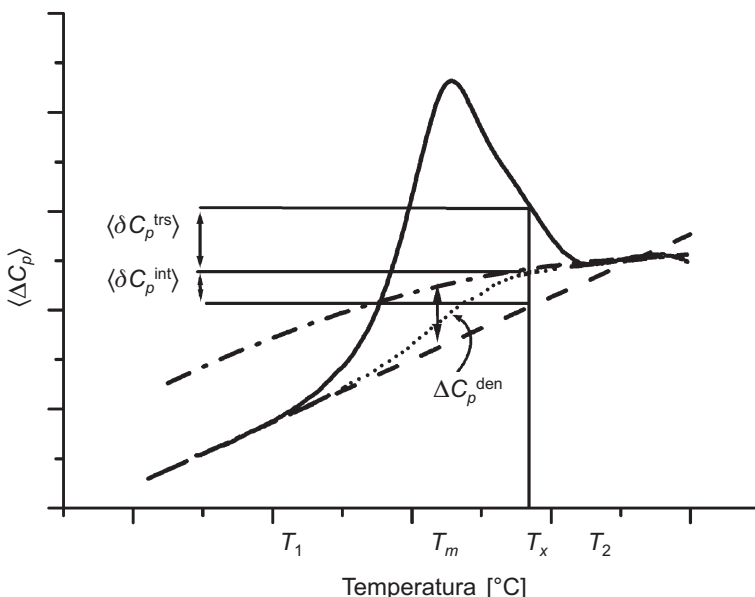
W pomiarach DSC mierzy się temperaturowe różnice między próbką a wzorcem w funkcji temperatury T . Dokładniej, mierzona jest moc P potrzebna do utrzymania zerowej różnicy temperatur między próbką i wzorcem przy liniowym wzroście temperatury. Moc jest przekształcana na pozorną molową nadmiarową pojemność cieplną $\langle \Delta C_p \rangle$ zgodnie z równaniem:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \frac{P}{\sigma m}, \quad (3.2)$$

gdzie: $\sigma = dT/dt$ jest szybkością skanowania, m jest liczbą moli białka w próbce.

Kalorymetrycznie mierzona różnica pojemności cieplnej między roztworem białka i rozpuszczalnikiem pozwala na wyznaczenie cząstkowych właściwych pojemności cieplnych białka jako funkcji temperatury (równanie (1.12)). Ze względu na bardzo małe stężenia białka (poniżej 10^{-4} M) w pomiarach mikrokalorymetrycznych pozorne molowe pojemności cieplne są często prezentowane jako cząstkowe molowe pojemności cieplne (ZIELENKIEWICZ, 2003).

Rysunek 2 przedstawia typową krzywą DSC dla procesu termicznej denaturacji białka w zakresie temperatur od T_1 do T_2 . Temperatura T_m , w której występuje maksimum w $\langle \Delta C_p \rangle$ może być przyjęta jako temperatura denaturacji białka T_d . Cząstkową molową pojemność cieplną natywnego białka $\langle C_{p,N} \rangle$ można przybliżyć funkcją liniową (kreskowana linia na rys. 2), a zdenaturowanego $\langle C_{p,D} \rangle$ potęgową, np. kwadratową (linia „kreska — kropka” na rys. 2). Zmiana pojemności cieplnej towarzysząca denaturacji $\Delta C_p^{\text{den}} = \langle C_{p,D}(T) \rangle - \langle C_{p,N}(T) \rangle$ jest zwykle dodatnia, ponieważ białko zdenaturowane ma większą pojemność cieplną niż natywne (JELESAROV, BOSSHARD, 1999). Dla białek globularnych mieści się najczęściej w przedziale wartości $0,3\text{—}0,7 \text{ JK}^{-1}\text{g}^{-1}$. Dodatnia wartość ΔC_p^{den} jest głównie konsekwencją efektów hydratacyjnych zdominowanych przez hydratację



Rys. 2. Ilustracja typowej krzywej DSC białka podlegającego termicznej denaturacji (opracowanie własne wg: JELESAROV, BOSSHARD, 1999)

grup niepolarnych, ekspozowanych na działanie rozpuszczalnika po zniszczeniu zwartej, zwiniętej konformacji białka.

Nadmiarowa cząstkowa pojemność cieplna, zdefiniowana jako

$$\langle \Delta C_p \rangle = \langle C_p \rangle - \langle C_{p,N} \rangle, \quad (3.3)$$

może być podzielona na dwie składowe:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \langle \delta C_p^{int} \rangle + \langle \delta C_p^{trs} \rangle. \quad (3.4)$$

Pierwsza z nich, wewnętrzna nadmiarowa pojemność cieplna, $\langle \delta C_p^{int} \rangle$, stanowi sumę wkładów od wszystkich stanów obecnych podczas realizacji przejścia ze stanu natywnego do zdenaturowanego. Druga, $\langle \delta C_p^{trs} \rangle$, ma swoje źródło we wzroście fluktuacji układu, kiedy białko przechodzi pomiędzy stanami o różnej entalpii w trakcie termicznej denaturacji. Ta składowa, nazywana nadmiarową pojemnością cieplną przejścia, jest zwykle znacznie większa niż $\langle \delta C_p^{int} \rangle$, co pokazano na rys. 2 dla temperatury T_x . Aby wyznaczyć $\langle \delta C_p^{int} \rangle$, należy dokonać ekstrapolacji funkcji $\langle C_{p,N}(T) \rangle$ i $\langle C_{p,D}(T) \rangle$ do obszaru przejścia (pomiędzy temperaturami T_1 i T_2) proporcjonalnie do postępu przejścia (linia kropkowana na rys. 2).

Nadmiarowa entalpia termicznej denaturacji ΔH_{den} jest polem pod funkcją nadmiarowej pojemności cieplnej przejścia ($\langle \delta C_p^{trs} \rangle$)

$$\Delta H_{den} = \int_{T_1}^{T_2} \langle \delta C_p^{trs} \rangle dT, \quad (3.5)$$

granice całkowania T_1 i T_2 są temperaturami, w których prawie wszystkie molekuly są odpowiednio w stanach: początkowym i końcowym (pole piku nad linią kropkowaną na rys. 2). Tak wyznaczona zmiana entalpii jest nazywana entalpią kalorymetryczną przejścia ΔH_{cal} .

Nadmiarową entropię denaturacji wyznacza się jako:

$$\Delta S_{den} = \int_{T_1}^{T_2} \langle \delta C_p^{trs} \rangle d \ln T. \quad (3.6)$$

Analiza funkcji $\langle \Delta C_p \rangle$ uzyskanej w pojedynczym eksperymencie DSC zatem pozwala opisać termodynamikę rozfałdowania białka globularnego. Jednakże różnica pomiędzy ekstrapolowanymi fragmentami linii bazowej przed i po przejściu wyznaczona w temperaturze przejścia jest tylko przybliżoną wartością zmiany pojemności cieplnej dla przejścia. Praktycznie trudno jest otrzymać dobre dane dotyczące ΔC_p^{den} z przesunięcia linii bazowej. Wartość tę wyznacza się w związku z tym z wykresu zależności ΔH przejścia jako funkcji temperatury przejścia (z nachylenia linii), którą można uzyskać np. przez zmianę pH wpływającą na temperaturę denaturacji.

Oprócz T_m jako charakterystyczne temperatury denaturacji T_d przyjmuje się:

1. $T_{1/2}$ — temperaturę, w której po 50% populacji białka jest odpowiednio w stanie natywnym i rozfałdowanym.
2. T_G — temperaturę, w której zmiana standardowej molowej energii Gibbsa dla przejścia (ΔG) jest równa zeru.

Należy zwrócić uwagę, że te trzy temperatury zbiegają się tylko dla przejść dwustanowych o stechiometrii 1:1, tj. $N \Leftrightarrow U$.

Stwierdzono, że przejścia termicznego rozfałdowania wielu białek globularnych można traktować jako procesy dwustanowe. Pokazano, że przejścia związane z odwracalną termiczną denaturacją rybonukleazy, lizozymu, chymotrypsyny, cytochromu *c* i mioglobiny mogą być opisane jako proces dwustanowy z odchyleniem nieprzekraczającym 5% (KHECHINASHVILI *et al.*, 1973; PRIVALOV, 1997).

Dla odwracalnego przejścia dwustanowego

$$N \Leftrightarrow U \quad (3.7)$$

stała równowagi K wynosi:

$$K = [U]/[N], \quad (3.8)$$

gdzie: $[U]$ i $[N]$ są stężeniami białka w stanach: rozfałdowanym U i natywnym N .

W danej temperaturze frakcje molekuł w stanie natywnym (f_N) i zdenaturowanym (f_U) wynoszą:

$$f_N = 1 - f_U = \frac{[N]}{[N] + [U]} = \frac{1}{1 + K}, \quad (3.9)$$

$$f_U = \frac{[U]}{[N] + [U]} = \frac{K}{1 + K}. \quad (3.10)$$

Entalpia rozważanego układu termodynamicznego w danej temperaturze może być wyrażona jako:

$$H(T) = f_N H_N + f_U H_U = H_N + f_U (H_U - H_N) = H_N + f_U \Delta H^0(T_d), \quad (3.11)$$

gdzie: H_N i H_U są entalpiami stanów: natywnego i zdenaturowanego. Wybierając stan natywny jako referencyjny, otrzymuje się entalpię nadmiarową jako:

$$\langle \Delta H^0(T) \rangle = f_U \Delta H^0(T_d), \quad (3.12)$$

skąd po zróżniczkowaniu mamy:

$$\langle \Delta C_p^0(T) \rangle = \frac{[\Delta H^0(T_d)]^2}{RT^2} [K / (1 + K)^2] + \Delta C_p^0 [K / (1 + K)]. \quad (3.13)$$

Równanie to umożliwia sprawdzenie zgodności doświadczalnych krzywych DSC z teoretycznymi, uzyskanymi na podstawie parametrów termodynamicznych wyznaczonych z założonego modelu przejścia.

Biorąc pod uwagę zależność pomiędzy zmianą energii swobodnej Gibbsa a stałą równowagi przy przejściu ze stanu N do U w warunkach równowagi:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[U]}{[N]} = -RT \ln K, \quad (3.14)$$

oraz równanie Gibbsa—Helmholtza, uzyskujemy:

$$\frac{\partial \ln([U] / [N])}{\partial T} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}. \quad (3.15)$$

Jest to równanie van't Hoffa, które pozwala na zinterpretowanie temperaturowej zależności równowagi pomiędzy dwoma stanami globalnymi. Nachylenie wykresu $\ln([U]/[N])$ względem temperatury może być użyte do określenia ΔH^0 . Wyznaczona w ten sposób entalpia określana jest jako entalpia van't Hoffa, ΔH_{vH}^0 .

Podobnie, startując z zależności:

$$\frac{\partial \Delta G^0}{\partial T} = -\Delta S^0, \quad (3.16)$$

mamy:

$$\frac{\partial RT \ln([U]/[N])}{\partial T} = \Delta S^0. \quad (3.17)$$

Wybierając to równanie do analizy przejścia termicznego, z nachylenia otrzymamy wartość zmiany entropii ΔS^0 . Ponieważ $\Delta H^0 = T_{1/2} \Delta S^0$, wielkości: $T_{1/2}$, ΔH^0 , ΔS^0 nie zmieniają się niezależnie. Specyfikacja dowolnych dwóch określa trzecią z nich.

Uwzględniając zależność wartości ΔH^0 i ΔS^0 od temperatury, mamy

$$\Delta G^0(T) = \Delta H^0(T) - T\Delta S^0(T). \quad (3.18)$$

Temperaturowa zależność ΔH^0 i ΔS^0 jest określona przez zmianę pojemności cieplnej ΔC_p^0 pomiędzy stanem rozfałdowanym i natywnym.

$$\Delta H^0(T) = \Delta H^0(T_R) + \int_{T_R}^T \Delta C_p^0 dT, \quad (3.19)$$

$$\Delta S^0(T) = \Delta H^0(T_R)/T_R + \int_{T_R}^T \Delta C_p^0 d \ln T. \quad (3.20)$$

Dotadnia zmiana pojemności cieplnej odzwierciedla fakt, że ilość ciepła wymaganego do zwiększenia temperatury roztworu białka rozfałdowanego jest większa niż dla białka sfałdowanego o tym samym stężeniu. Jeśli wartość ΔC_p^0 słabo zależy od temperatury, to założenie o jej stałości nie prowadzi do znaczących błędów w określeniu innych parametrów (PRIVALOV, GILL, 1988), ΔG^0 można zatem przedstawić jako:

$$\begin{aligned} \Delta G^0(T) &= [\Delta H^0(T_R) + \Delta C_p^0(T - T_R)] - T[\Delta S^0(T_R) + \Delta C_p^0 \ln(T/T_R)] = \\ &= \Delta H^0(T_R) - T\Delta S^0(T_R) + \Delta C_p^0[(T - T_R) - T \ln(T/T_R)], \end{aligned} \quad (3.21)$$

gdzie T_R jest dogodnie wybraną temperaturą odniesienia.

Gdy T_R jest równe $T_{1/2}$, wtedy ΔG^0 jest równa zero, a $\Delta S^0 = \Delta H^0/T_{1/2}$.

$$\Delta G^0(T) = \Delta H^0(T_{1/2}) \left(1 - \frac{T}{T_{1/2}} \right) + \Delta C_p^0 [(T - T_{1/2}) - T \ln(T / T_{1/2})]. \quad (3.22)$$

Równanie to jest nazywane zmodyfikowanym równaniem Gibbsa—Helmholtza. Dzieliąc je obustronnie przez $-RT$, uzyskujemy zależność $\ln K$ od T . Równanie to może służyć do wyznaczenia wartości: $T_{1/2}$, $\Delta H(T_{1/2})$ i ΔC_p^0 przez dopasowanie do niego danych doświadczalnych. Należy zauważyć jednakże, że takie dopasowanie zakłada, że wartości doświadczalne są prawdziwą miarą K , co jest prawdą wtedy, gdy nie występują stabilne stany pośrednie.

W przypadku wielu białek proces rozfałdowania jest bardziej złożony i nie można go uznać za dwustanowy (MATEO, PRIVALOV, 1981; PRIVALOV, 1982; PRIVALOV, DRAGAN, 2007). Z porównania entalpii van't Hoffa (ΔH_{vH}) i kalorymetrycznej (ΔH_{cal}) można wnioskować o istnieniu stanów pośrednich w procesie rozfałdowania (FREIRE, 1994; PRIVALOV, 1996). Na podstawie analizy dekonwolucyjnej danych DSC można także uzyskać charakterystyki termodynamiczne tych stanów (FREIRE, BILTONEN, 1978 a, b; PRIVALOV, POTEKHIN, 1986; FREIRE, 1994).

Dla kooperatywnego przejścia dwustanowego $\Delta H_{cal} = \Delta H_{vH}$. Relacja $\Delta H_{vH} > \Delta H_{cal}$ odzwierciedla sytuację, gdy przejście jest węższe od spodziewanego. Może ona świadczyć o tym, że jednostka kooperatywna jest większa od założonej np. z powodu tworzenia dimerów lub oligomerów. Stosunek entalpii van't Hoffa do kalorymetrycznej wskazuje liczbę molekuł białka włączonych w ulegającą rozfałdowaniu jednostkę kooperatywną. Przyczyną anomalnego wyostrenia piku DSC mogą być jednak także procesy nieodwracalne, takie jak egzotermiczna agregacja rozfałdowanego białka. W takim przypadku występują efekty kinetyczne, powodujące zależność kształtu i pozycji piku reprezentującego przejście od szybkości skanowania (SANCHEZ-RUIZ *et al.*, 1988; GALISTEO *et al.*, 1991). Jeśli $\Delta H_{vH} > \Delta H_{cal}$, a stężenie białka zostało poprawnie określone i wykonano prawidłową korekcję linii bazowej, może to oznaczać również, że nie całe białko było prawidłowo zwinięte. Odwrotna sytuacja, $\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$, występuje wtedy, gdy przejście jest szersze, niż należałoby się spodziewać dla przejścia dwustanowego o danej wartości ΔH_{cal} . Rozfałdowanie przebiega wówczas w kilku etapach. Może się to w pewnych przypadkach uwidocznić na termogramach w postaci piku ze zboczem lub oddzielnych pików, które po dekonwolucji mogą być skorelowane z rozfałdowaniem zidentyfikowanych domen lub podjednostek badanego białka (PRIVALOV, 1982).

Wykresy funkcyjnej zależności ΔG^0 od temperatury znane są jako „krzywe stabilności białka” (BECKTEL, SCHELLMAN, 1987). Mają one kształt lekko skośnej paraboli, przecinającej oś temperatury w dwóch punktach, odpowia-

dających temperaturom tzw. zimnej i gorącej denaturacji. Zimna denaturacja przewidziana została teoretycznie (BRANDTS, 1964), a następnie zaobserwowana doświadczalnie dla mioglobiny i innych białek globularnych (PRIVALOV *et al.*, 1986, 1997). Stosunkowo małe zmiany energii swobodnej Gibbsa obserwowane w procesie rozfałdowania białek są wynikiem uwzględnienia wkładów związanych ze zmianami entalpii i entropii, które są znacznie większe i silniej zależą od temperatury. Typowe zmiany entalpii rozfałdowania to $+1 \text{ kJ mol}^{-1}$ na resztę aminokwasową w temperaturze 25°C , gwałtownie rosnące ze wzrostem temperatury. Wkład entropowy jest zwykle także dodatni, z przeciętną zmianą entropii $+2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ na resztę aminokwasową w temperaturze 25°C , równie szybko rosnący ze wzrostem temperatury. Większość białek charakteryzuje się największą stabilnością w fizjologicznym zakresie temperatur (COOPER, 1999).

3.2. Aspekty kinetyczne w procesie denaturacji białek – model Lumry–Eyringa

Śledząc doniesienia literaturowe dotyczące kalorymetrycznych badań procesu termicznej denaturacji białek, dostrzega się powszechne stosowanie następującego kryterium klasyfikacji przejścia:

- 1) Jeśli proces denaturacji może być uważany za odwracalny i związane z nim endotermiczne przejście obserwowane na krzywej DSC nie zależy od szybkości skanowania, można opracować dane eksperymentalne w ramach termodynamiki równowagowej;
- 2) Jeśli proces jest nieodwracalny i zależy od szybkości skanowania, stosujemy podejście kinetyczne.

Występują jednakże złożone procesy, których jednoznaczne zaklasyfikowanie według powyższego kryterium nie jest możliwe.

W uproszczony, ale stosunkowo ogólny sposób proces denaturacji białka może być opisany modelem Lumryego i Eyringa (L—E) dyskutowanym np. w pracach: SANCHEZ-RUIZ *et al.*, 1988; SANCHEZ-RUIZ, 1992:



gdzie: N , U , I — to kolejno formy: natywna, rozfałdowana, nieodwracalnie zdenaturowana, K — stała równowagi pomiędzy stanami N i U , k — stała szybkości dla procesu nieodwracalnego $U \rightarrow I$. W pewnych przypadkach model L—E redukuje się do jednokrokowego prostego modelu nieodwracalnego, a w innych do poprawnego opisu należy zastosować jeszcze bardziej złożone modele.

W nieco innej formie można ten model zapisać jako:



Zawiera on dwa kolejne etapy:

1. Odwracalną denaturację natywnego białka (N) ze stałą równowagi $K = k_1/k_2$, prowadzącą do rozfałdowanego lub częściowo rozfałdowanego stanu (U).
2. Nieodwracalną zmianę (częściowo) rozfałdowanego stanu ze stałą szybkości k_3 , prowadzącą do stanu końcowego (I), z którego nie można wrócić do natywnego białka.

Zależnie od wzajemnych relacji między stałymi szybkości poszczególnych procesów model sprowadza się do następujących uproszczonych sytuacji:

- $k_3 \ll k_2$: rozfałdowanie jest 2-stanowym procesem odwracalnym,
- $k_3 \gg k_2$: rozfałdowanie jest 2-stanowym procesem nieodwracalnym.

Po założeniu, że: 1) ustalona jest równowaga między stanami N i U , oraz 2) entalpia rozfałdowania ΔH_u jest wartością stałą, mamy:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H_u}{RT^2}, \quad (3.25)$$

$$\ln K = -\frac{\Delta H_u}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{1/2}}\right), \quad (3.26)$$

$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{x_U}{x_N} = \exp\left\{-\frac{\Delta H_u}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{1/2}}\right)\right\}, \quad (3.27)$$

gdzie: x_U, x_N — molowe frakcje stanów: rozfałdowanego i natywnego, $T_{1/2}$ — temperatura, w której $x_U = x_N$

Odnosnie do drugiego etapu w modelu L—E, z założeniem, że nieodwracalny krok $U \rightarrow I$ jest reakcją pierwszego rzędu, a stała szybkości reakcji k zmienia się z temperaturą zgodnie z równaniem Arrheniusa:

$$k(\text{min}^{-1}) = \exp\left\{-\frac{E}{R} \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*}\right]\right\}, \quad (3.28)$$

gdzie: E — energia aktywacji, T^* — temperatura, w której $k = 1 \text{ min}^{-1}$, otrzymuje się równanie na szybkość nieodwracalnego procesu tworzenia stanu I:

$$\frac{d[I]}{dt} = k \cdot [U] \quad (3.29)$$

lub

$$\frac{dx_I}{dt} = k \cdot x_U, \quad (3.30)$$

gdzie: x_I — molowa frakcja stanu końcowego I. Korzystając z zależności $x_N + x_U + x_I = 1$, mamy $x_U = (1 - x_I)K/(1 + K)$. Zatem:

$$\frac{dx_I}{dt} = \frac{kK}{K + 1}(1 - x_I), \quad (3.31)$$

czyli x_I zmienia się w czasie ze stałą szybkości $kK/(K + 1)$.

Uwzględniając szybkość skanowania

$$v = \frac{dT}{dt}, \quad (3.32)$$

$$\frac{dx_I}{dT} = \frac{1}{v} \frac{kK}{K + 1}(1 - x_I). \quad (3.33)$$

Całkując to równanie od niskiej temperatury T_0 (w której szybkość reakcji jest zaniedbywana i $x_I = 0$) do temperatury T , otrzymujemy:

$$x_I = 1 - \exp\left\{-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{kK}{K + 1} dT\right\}. \quad (3.34)$$

Następnie wyliczamy:

$$x_U = \frac{K}{K + 1} \exp\left\{-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{kK}{K + 1} dT\right\}, \quad (3.35)$$

$$x_N = \frac{K}{K + 1} \exp\left\{-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{kK}{K + 1} dT\right\}, \quad (3.36)$$

Nadmiarowa entalpia:

$$\langle \Delta H \rangle = x_U \Delta H_U + x_I \Delta H, \quad (3.37)$$

gdzie: ΔH_U i ΔH są odpowiednio entalpiami stanów U i I (biorąc stan N jako referencyjny).

Zauważmy, że entalpia stanu końcowego ΔH jest równa entalpii kalorymetrycznej przejścia DSC, ponieważ ostatecznie wszystkie molekuly białka znajdują się w stanie końcowym. Jeśli entalpia nieodwracalnego przejścia $U \rightarrow I$ jest mała (w porównaniu z entalpią kooperatywnego rozfałdowania), to $\Delta H_U \approx \Delta H$. Załóżmy, że entalpia procesu $U \rightarrow I$ jest zerowa, wtedy $\Delta H_U = \Delta H$, a

$$\langle \Delta H \rangle = \Delta H(x_U + x_I) = \Delta H(1 - x_N) \quad (3.38)$$

i nadmiarowa pojemność cieplna

$$\langle \Delta C_p \rangle = -\Delta H \frac{dx_N}{dT} \quad (3.39)$$

(przy różniczkowaniu założono, że $\Delta H = \text{const}$).

Ostatecznie, różniczkując x_N względem temperatury i podstawiając do ostatniego równania, otrzymujemy:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \frac{K\Delta H}{(K+1)^2} \left(\frac{k}{v} + \frac{\Delta H}{RT^2} \right) \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{kK}{K+1} dT \right) dT. \quad (3.40)$$

Równanie to można porównać z równaniem odpowiadającym 2-stanowemu odwracalnemu rozfałdowaniu według modelu $N \leftrightarrow U$:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \frac{\Delta H^2}{RT^2} \frac{K}{(K+1)^2}, \quad (3.41)$$

które można uzyskać z równania (3.40), jeśli $k = 0$ dla dowolnej temperatury (proces nieodwracalny nie zachodzi) lub $1/v = 0$ (nieskończona szybkość skanowania).

Znanych jest wiele modyfikacji modelu L—E, opisanych w pracach: SANCHEZ-RUIZ *et al.*, 1988; SANCHEZ-RUIZ, 1992; KURGANOV *et al.*, 1997; FESSAS *et al.*, 2001; MILIARDI *et al.*, 1994, 1996; LYUBAREV *et al.*, 1998, 2000.

4. Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC

4.1. Podstawy analizy dekonwolucyjnej

Głównym celem analizy dekonwolucyjnej funkcji nadmiarowej pojemności cieplnej jest określenie liczby stanów obecnych podczas termicznego rozkładu i parametrów termodynamicznych dla każdego z tych stanów. Podstawy takiej analizy dekonwolucyjnej opracowali E. FREIRE, R.L. BILTONEN w 1978 roku, a w następnych latach algorytmy dekonwolucyjne były rozwijane i udoskonalane (FREIRE, BILTONEN, 1978; PRIVALOV, POTEKHIN, 1986; KIDOKORO *et al.*, 1987, 1988; FREIRE, 1994, 1995). Zauważono (FREIRE, BILTONEN, 1978; ROBERTSON, MURPHY, 1997), że suma statystyczna, jak również wszystkie wielkości termodynamiczne związane z wielostanowym przejściem mogą w zasadzie być wygenerowane z pojedynczego eksperymentu kalorymetrycznego. Otrzymane z pomiarów kalorymetrycznych informacje termodynamiczne mogą być powiązane bezpośrednio ze strukturą białka (FREIRE, 1994).

Profile termicznego rozkładu makromolekuł są zwykle otrzymywane przez monitorowanie indukowanych temperaturowo zmian pewnej obserwabli α . Kiedy przejście jest dwustanowe, tzn. nie ma żadnych termodynamicznie stabilnych stanów pośrednich, jedynymi wkładami do $\langle\alpha\rangle$ są te od początkowego stanu pofałdowanego i końcowego stanu rozkładanego. W przeciwnym przypadku $\langle\alpha\rangle$ zawiera wkłady od wszystkich rodzajów stanów w równowadze. W ogólności, $\langle\alpha\rangle$ jest równe:

$$\langle\alpha\rangle = \sum_{i=0}^n \alpha_i f_i, \quad (4.1)$$

gdzie: α_i i f_i reprezentują odpowiednio obserwabłą i frakcję dla i -tego stanu. Frakcję f_i można wyrazić jako:

$$f_i = \frac{e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}}}{\sum_{i=0}^n e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}}}, \quad (4.2)$$

gdzie: $\Delta G_i = \Delta H_i - T\Delta S_i$ jest energią Gibbsa i -tego stanu, R — stałą gazową, a T — temperaturą. Wyrażenie w mianowniku jest sumą statystyczną Q .

Obserwabłą użytą do śledzenia przejścia może być nadmiarowa entalpia względem stanu początkowego $\langle \Delta H \rangle$. Mamy wówczas:

$$\langle \Delta H \rangle = \sum_{i=0}^n \Delta H_i f_i, \quad (4.3)$$

gdzie każde ΔH_i reprezentuje różnicę entalpii między i -tym stanem a stanem początkowym, tj. $\Delta H_i = (H_i - H_0)$ w danej temperaturze.

Funkcje nadmiarowe entalpii, jak i ciepła właściwego zawierają termodynamiczne informacje o stanach cząsteczki występujących w rozpatrywanym przedziale temperatur. Jest to wyrażone przez ogólną zależność termodynamiki statystycznej:

$$\langle \Delta H \rangle = RT^2 \frac{\partial \ln Q}{\partial T}. \quad (4.4)$$

Wyjątkowość entalpii nadmiarowej jako obserwabli wiąże się z tym, że populacja każdego ze stanów jest funkcją ΔH_i , co wynika z równania (4.2). Dla żadnej innej obserwabli wartości α_i nie są matematycznie związane z odpowiednimi wartościami f_i (FREIRE, 1995).

Procedura dekonwolucyjna składa się z dwóch części:

- 1) wstępnej estymacji liczby stanów i związanych z nimi parametrów termodynamicznych,
- 2) optymalizacji parametrów z użyciem nieliniowej metody najmniejszych kwadratów (NMNK).

Dopasowanie NMNK dla $\langle \Delta C_p \rangle$ musi być wykonane z użyciem równania:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \sum_{i=1}^n \Delta H_i (\partial f_i / \partial T) + \sum_{i=1}^n f_i \Delta C_{p,i} = \frac{\langle \Delta H^2 \rangle - \langle \Delta H \rangle^2}{RT^2} + \sum_{i=1}^n f_i \Delta C_{p,i}. \quad (4.5)$$

Po uzyskaniu zbieżności nieliniowa procedura najmniejszych kwadratów zwraca najlepszy zestaw parametrów, który minimalizuje sumę kwadratów reszt SSR między wartościami wyliczonymi i eksperymentalnymi

$$SSR = \sum \left(\langle \Delta C_p \rangle_{calc} - \langle \Delta C_p \rangle_{exper} \right)^2. \quad (4.6)$$

Oceny jakości dopasowania dokonuje się na podstawie χ^2 , zdefiniowanej jako:

$$\chi^2 = \frac{1}{n-m} \sum_{i=1}^n [y_i - y(x_i, a_j)]^2, \quad (4.7)$$

gdzie: y_i — wartości zmierzone doświadczalnie, $y(x_i, a_j)$ — wartości wyznaczone z modelu, a_j — parametry dopasowania, n — liczba punktów pomiarowych, m — liczba parametrów dopasowania.

Algorytm Levenberga—Marquardta, startujący z zainicjowanych wartości parametrów, minimalizuje χ^2 w wyniku wykonania serii iteracji wartości parametrów i wyliczenia wartości χ^2 przy każdym kroku.

4.2. Przejścia niezależne

Założmy, że białko składa się z pewnej liczby strukturalnych domen: A , B , C , ..., z których każda rozfałdowuje się niezależnie od pozostałych. Stałe równowagi dla procesów przejścia pomiędzy formami: natywną (zwiniętą) i rozfałdowaną (rozwinętą) dla każdej z domen

$$A \rightleftharpoons A', B \rightleftharpoons B', C \rightleftharpoons C', \dots \quad (4.8)$$

wyrażają się przez frakcje molekuł w odpowiednich stanach:

$$K_A = \frac{f_{A'}}{f_A}, K_B = \frac{f_{B'}}{f_B}, \dots \quad (4.9)$$

Molowa entalpia układu w danej temperaturze T wynosi:

$$H = H_N + f_{A'} \Delta H_A + f_{B'} \Delta H_B + \dots, \quad (4.10)$$

przy czym H_N odnosi się do natywnej formy białka, gdy wszystkie domeny są w stanie zwiniętym.

Jako temperaturowa pochodna entalpii molowa pojemność cieplna układu może być wyrażona jako:

$$C_p = C_{pN} + \left[f_{A'} \Delta C_{pA} + \Delta H_A \left(\frac{\partial f_{A'}}{\partial T} \right) \right] + \dots \quad (4.11)$$

gdzie: C_{pN} jest molową pojemnością cieplną układu w stanie natywnym, ΔC_{pA} jest zmianą pojemności cieplnej przy rozfałdowaniu domeny A , a człon w nawiasie kwadratowym powtarza się w równaniu dla kolejnych domen.

Pamiętając, że

$$f_A = 1 - f_{A'}, \quad (4.12)$$

mamy:

$$f_{A'} = \frac{K_A}{1 + K_A} \quad (4.13)$$

oraz

$$\left(\frac{\partial f_{A'}}{\partial T} \right) = \left(\frac{K_A}{(1 + K_A)^2} \right) \left(\frac{\partial \ln K_A}{\partial T} \right). \quad (4.14)$$

Zgodnie z równaniem van't Hoffa

$$\left(\frac{\partial \ln K_A}{\partial T} \right) = \frac{\Delta H_A^{vH}}{RT^2}, \quad (4.15)$$

gdzie: ΔH_A^{vH} jest zmianą entalpii van't Hoffa dla domeny A , wyraża efekt cieplny odpowiadający kooperatywnej jednostce, biorącej udział w procesie rozfałdowania.

Zatem

$$\langle \Delta C_p \rangle = \left[\frac{K_A \Delta C_{pA}}{1 + K_A} + \frac{K_A \Delta H_A^{vH} \Delta H_A}{(1 + K_A)^2 RT^2} \right] + \dots \quad (4.16)$$

Jest to uniwersalne równanie, które może być zastosowane zarówno w przypadku przejść dwustanowych, jak i niedwustanowych, pamiętając, że występujące w nim parametry odnoszą się do danej temperatury T .

4.2.1. Model niezależnych przejść dwustanowych, uwzględniający efekty ΔC_p

Jeśli założymy, że każde przejście jest dwustanowe, to entalpie van't Hoffa będą równe odpowiednim entalpiom kalorymetrycznym. Zakładając dodatkowo, że C_{pN} może być wyrażona jako liniowa funkcja temperatury ($C_{pN} = B_0 + B_1T$), otrzymamy:

$$\langle C_p(T) \rangle = B_0 + B_1T + \left[\frac{K_A(T)\Delta C_{pA}}{1 + K_A(T)} + \frac{K_A(T)(\Delta H_A(T))^2}{(1 + K_A(T))^2 RT^2} \right] + \dots \quad (4.17)$$

Przyjmując T_{mA} jako temperaturę przejścia, w której $K_A(T)$ równa jest jeden, korzystając z zależności

$$\Delta H_A(T) = \Delta H_{mA} + \Delta C_{pA}(T - T_{mA}) \quad (4.18)$$

i całkując równanie (4.15) od T_{mA} do T , mamy:

$$K_A(T) = \exp \left\{ \frac{-\Delta H_{mA}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_{mA}} \right) - \frac{\Delta C_{pA}}{RT} \left(T - T_{mA} - T \ln \frac{T}{T_{mA}} \right) \right\}. \quad (4.19)$$

Podstawiając (4.18) i (4.19) do równania (4.17), można wyznaczyć pojemność cieplną układu $C_p(T)$ w dowolnej temperaturze T , mając dane niezależne od temperatury parametry dopasowania: B_0 , B_1 , T_{mA} , ΔH_{mA} , ΔC_{pA} , T_{mB} , ΔH_{mB} , ΔC_{pB} , ...

Procedura dopasowania eksperymentalnych krzywych DSC w ramach tego modelu z zastosowaniem specjalistycznego oprogramowania MicoCal Origin rozpoczyna się od wskazania liczby przejść oraz wyjściowych dla procesu dopasowania wartości temperatur T_m . Odgadnięte zostają pozostałe parametry dopasowania, a następnie używając równań (4.17)–(4.19), wyliczana jest wartość $C_p(T)$. Porównanie tej wartości z eksperymentalną prowadzi, z zastosowaniem nieliniowej metody najmniejszych kwadratów Marquardta, do poprawy parametrów dopasowania. Ponownie przeprowadzane są obliczenia wartości $C_p(T)$. Taki proces iteracyjny kontynuowany jest do momentu, gdy wystąpi brak poprawy jakości dopasowania wyliczonych wartości $C_p(T)$ do eksperymentalnych $C_p(T)_{\text{exp}}$, co oceniane jest na podstawie wartości χ^2 .

4.2.2. Model niezależnych przejść dwustanowych, z wykluczeniem efektów ΔC_p

W tym modelu zakłada się, że zmiany pojemności cieplnych ΔC_{pA} , ΔC_{pB} , ... są równe zero, co upraszcza równania (4.17)–(4.19). Przed rozpoczęciem procedury dopasowania odejmuje się linię bazową, co zapewnia $C_{pN} = 0$ dla wszystkich temperatur, więc B_0 i B_1 nie są już parametrami dopasowania. $\Delta H_A(T)$ może być zastąpione przez ΔH_{mA} (tzn. zmiany ciepła są temperaturowiezależne, jeśli nie ma zmian pojemności cieplnej). Uzyskujemy wtedy:

$$\langle C_p(T) \rangle = \frac{K_A(T)(\Delta H_A(T))^2}{(1 + K_A(T))^2 RT^2} + \dots \quad (4.20)$$

$$K_A(T) = \exp \left\{ \frac{-\Delta H_{mA}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_{mA}} \right) \right\}. \quad (4.21)$$

gdzie człon po prawej stronie równania (4.20) musi być powtórzony dla każdego z przejść, a stałe równowagi wyliczone dla każdego przejścia analogicznie do równania (4.21).

Parametrami dopasowania są w tym przypadku T_{mA} , ΔH_{mA} , T_{mB} , ΔH_{mB} , ..., a procedura dopasowania krzywej jest taka sama, jak omówiono w poprzednim modelu.

4.2.3. Model niezależnych przejść niedwustanowych

Ten model jest stosowany tylko w przypadku $\Delta C_p = 0$. Przed procedurą dopasowania należy odjąć progresywną linię bazową od danych eksperymentalnych, co sprowadza także C_{pN} do zera dla wszystkich temperatur. Korzystając z równania (4.16), mamy:

$$\langle C_p(T) \rangle = \frac{K_A(T)\Delta H_A^{vH}\Delta H_A}{(1 + K_A(T))^2 RT^2} + \dots \quad (4.22)$$

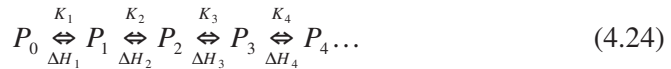
W tym przypadku wzory na stałe równowagi zawierają entalpie van't Hoffa, a nie kalorymetryczne:

$$K_A(T) = \exp \left\{ \frac{-\Delta H_{mA}^{vH}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_{mA}} \right) \right\}. \quad (4.23)$$

Równania (4.22) i (4.23) służą do dopasowania krzywej w tym modelu, a parametrami dopasowania są: $T_{mA}, \Delta H_{mA}, \Delta H_{mA}^{vH}, T_{mB}, \Delta H_{mB}, \Delta H_{mB}^{vH} \dots$

4.3. Przejścia sekwencyjne

Przejścia sekwencyjne występują wówczas, gdy rozfałdowanie jednej z domen białka wpływa na rozfałdowanie kolejnych. Model sekwencyjny narzuca dokładny porządek rozfałdowywania się poszczególnych domen (np. w pierwszym kroku zawsze jest to domena A, w drugim domena B itd.).



Całkowite molowe ciepło zawarte w układzie (względem wartości zero przypisanej stanowi P_0) wynosi:

$$H = f_0 \cdot 0 + f_1 \Delta H_1 + f_2 (\Delta H_1 + \Delta H_2) + f_3 (\Delta H_1 + \Delta H_2 + \Delta H_3) + \dots \quad (4.25)$$

gdzie: f_i i ΔH_i ($i = 0, 1, 2, \dots$) to odpowiednio frakcje stanów i zmiany entalpii molowej dla każdego kroku. Używając wartości K , wszystkie wartości f mogą być odniesione do f_0 , zatem:

$$1 = f_0 + f_1 + f_2 + f_3 + \dots \quad (4.26)$$

$$1 = f_0 (1 + K_1 + K_1 K_2 + K_1 K_2 K_3 + \dots) \quad (4.27)$$

$$f_0 = \frac{1}{Q}, f_1 \frac{K_1}{Q}, f_2 \frac{K_1 K_2}{Q}, \dots \quad (4.28)$$

gdzie

$$Q = 1 + K_1 + K_1 K_2 + K_1 K_2 K_3 + \dots \quad (4.29)$$

Podstawienie równań (4.28) do (4.25) oraz zróżniczkowanie po temperaturze (wartości ΔH są traktowane w modelu sekwencyjnym jako niezależne od temperatury) prowadzi do końcowego wyrażenia na pojemność cieplną układu:

$$\begin{aligned}
\langle C_p(T) \rangle = & \left(K_1(T) \frac{\Delta H_1^2}{RT^2Q} + K_1(T)K_2(T) \frac{(\Delta H_1 + \Delta H_2)^2}{RT^2Q} + \dots \right) - \\
& - [K_1(T)\Delta H_1 + K_1(T)K_2(T)(\Delta H_1 + \Delta H_2) + \dots] \times \\
& \times \left(K_1(T) \frac{\Delta H_1}{RT^2Q^2} + K_1(T)K_2(T) \frac{(\Delta H_1 + \Delta H_2)}{RT^2Q^2} + \dots \right),
\end{aligned} \tag{4.30}$$

przy czym stałe równowagi wylicza się, korzystając z wzorów:

$$K_1(T) = \exp\left(\frac{-\Delta H_1}{R} \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{m1}}\right]\right), \tag{4.31}$$

$$K_2(T) = \exp\left(\frac{-\Delta H_2}{R} \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{m2}}\right]\right). \tag{4.32}$$

Parametrami dopasowania są: T_{m1} , ΔH_1 , T_{m2} , ΔH_2 , ..., a procedura dopasowania jest taka sama, jak opisana dla przejść niezależnych.

4.4. Pojedyncze przejście dwustanowe z dysocjacją podjednostek

Model zakłada, że jednocześnie z procesem termicznego rozfałdowania makromolekuły składającej się z n podjednostek następuje jej dysocjacja na te podjednostki:



Stała równowagi

$$K = \frac{[U]^n}{[N_n]}, \tag{4.34}$$

gdzie w nawiasach kwadratowych dane są stężenia molowe danego typu molekuł. Jeśli przez f oznaczymy frakcję makromolekuł w stanie U , to $1-f$ będzie frakcją molekuł w stanie N_n . Przyjmując C_t jako całkowite stężenie molowe białka (wyrażone dla n -meru), mamy:

$$1 - f = \frac{[N_n]}{C_t}, \quad f = \frac{[U]}{nC_t}, \quad (4.35)$$

$$K = \frac{f^n}{1-f} n^n C_t^{n-1}. \quad (4.36)$$

Całkując wyrażenie:

$$\frac{\partial \ln K(T)}{\partial \frac{1}{T}} = \frac{-\Delta H(T)}{R} \quad (4.37)$$

od temperatury T_m , w której $f = 0,5$, do danej temperatury T , oraz korzystając z zależności (4.18), otrzymujemy:

$$K(T) = 0,5^{n-1} n^n C_t^{n-1} \exp \left\{ \frac{-\Delta H_m}{RT} \right\} \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{RT} \left(T - T_m - T \ln \frac{T}{T_m} \right). \quad (4.38)$$

Znając $K(T)$, można wyznaczyć $f(T)$ z (4.36) metodami numerycznymi oraz nadmiarową pojemność cieplną z równania:

$$\langle C_p(T) \rangle = B_0 + B_1(T) + f(T) \Delta C_p + \frac{\Delta H(T)}{RT^2} \left(\frac{1-f(T)}{1-n + \frac{n}{f(T)}} \right). \quad (4.39)$$

5. Proces termicznej denaturacji albuminy w roztworach wodnych

5.1. Charakterystyka DSC termicznej przemiany pomiędzy stanem natywnym i zdenaturowanym albuminy

Przemiany konformacyjne zachodzące podczas termicznej denaturacji białek w roztworach wodnych związane są ze zniszczeniem licznych słabych wiązań stabilizujących cząsteczkę białka oraz ze zmianami hydratacji białka, co zapewnia mierzalną zmianę entalpii. Dzięki temu jedną z technik umożliwiających badanie przebiegu termicznej denaturacji białek jest różnicowa kalorymetria skaningowa. Badania FTIR (WANG *et al.*, 2005) wykazały, że podatność HSA na termiczną denaturację jest mniejsza wtedy, gdy białko znajduje się w stanie stałym (w postaci suchego proszku lub filmu), a nie w roztworach wodnych. W pierwszym przypadku obserwuje się większą odwracalność temperaturą indukowanych zmian (zachodzących przy ogrzewaniu białka w stanie stałym aż do 200°C).

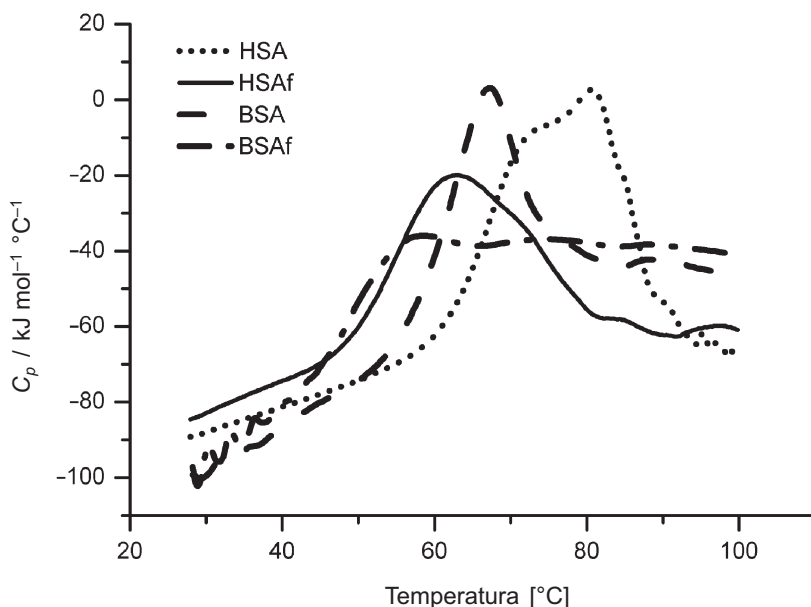
Przejście białka ze stanu natywnego w zdenaturowany, polegające na rozfałdowaniu łańcucha polipeptydowego pod wpływem rosnącej temperatury (nie biorąc pod uwagę możliwych zjawisk towarzyszących, np. agregacji), jest procesem endotermicznym. Rozfałdowaniu białek globularnych towarzyszy zwykle dodatnia zmiana pojemności cieplnej. Przypisywana jest ona najczęściej hydratacji niepolarnych grup schowanych we wnętrzu białka w stanie natywnym, a odsłanianych podczas rozfałdowania makromolekuły. Dokładniej, interpretując zmiany pojemności cieplnej w procesie denaturacji, należy uwzględnić wkłady pochodzące zarówno od grup niepolarnych, jak i polarnych. Są one przeciwnych znaków (PRIVALOV, MAKHATADZE, 1992; FREIRE, 1994; MAKHATADZE, PRIVALOV,

1995; GOMEZ *et al.*, 1995). W nowszych doniesieniach podkreśla się konieczność brania pod uwagę także wkładów niezwiązanych z hydratacją białka (PRABHU, SHARP, 2005).

Przegląd literatury z ostatnich lat pokazuje, że odzwierciedlające termiczną denaturację albuminy przejście obserwowane techniką DSC zależy od pochodzenia białka, jego stężenia, pH, siły jonowej, dodatków stabilizujących i destabilizujących, wiązania ligandów, rodzaju rozpuszczalnika, jak również warunków prowadzenia eksperymentu (KOSA *et al.*, 1998 b; ROSS, SHRAKE, 1988; BLEUSTEIN *et al.*, 2000 b; BARONE *et al.*, 1992, 1995; GIANCOLA *et al.*, 1997; YAMASAKI *et al.*, 1990, 1991, 1992; PICO, 1997; CELEJ *et al.*, 2005; ANRAKU *et al.*, 2007; MICHNIK *et al.*, 2005 a, 2006 a).

Badania, których wyniki przedstawiane są w niniejszej pracy, wykonywane były w ustalonych warunkach doświadczalnych (przy określonym dla danego rodzaju badań stężeniu białka, szybkości skanowania, pH roztworu), o ile ich celem nie było poznanie zależności od tych parametrów. Wartości parametrów charakteryzujących pomiary DSC w zrealizowanych rodzajach eksperymentów zestawiono w tabeli D1 (rozdział D IV *Dodatku*). Ze względu na to, że nie stosowano roztworów buforowych, kontrolowano wartość pH. Z wyjątkiem serii badań w funkcji pH nie zmieniała się ona w trakcie eksperymentu w granicach $\pm 0,5$.

Na rys. 3 pokazano uzyskane w tych samych warunkach krzywe DSC charakterystyczne dla procesu termicznego rozfałdowania cząsteczki albuminy

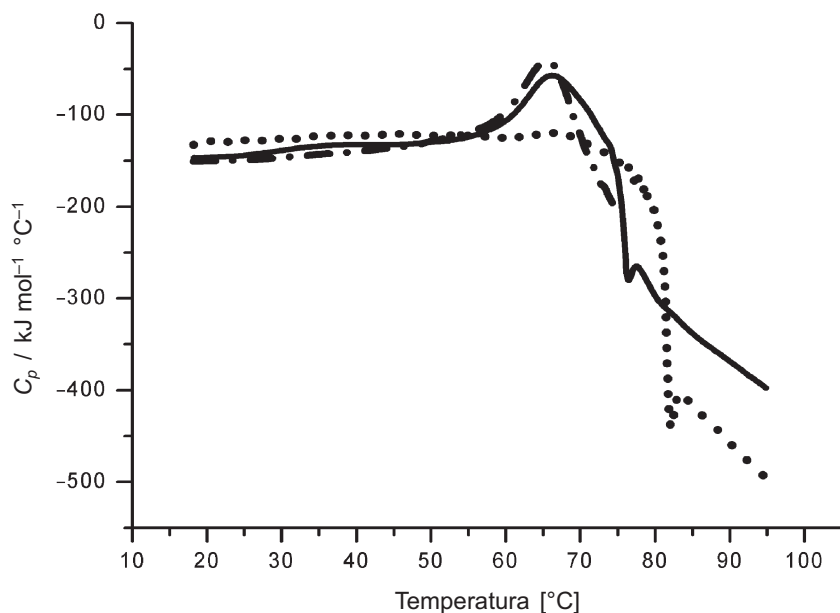


Rys. 3. Krzywe DSC odtłuszczonej i nieodtłuszczonej albuminy ludzkiej i wołowej w roztworach wodnych (stężenie $4,4 \cdot 10^{-5}$ M, pH 5,5÷6,0) otrzymane przy szybkości skanowania $0,67^\circ\text{C min}^{-1}$ (MICHNIK *et al.*, 2006 a)

ludzkiej nieodtłuszczonej (HSA) i odtłuszczonej (HSAf) oraz wołowej nieodtłuszczonej (BSA) i odtłuszczonej (BSAf) (MICHNIK *et al.*, 2006 a). Wyniki wskazują na różny przebieg tego procesu zarówno dla albumin różnego pochodzenia, jak i w zależności od zawartości kwasów tłuszczowych.

W pewnych warunkach procesowi rozfałdowania towarzyszy agregacja białka, która jest najczęściej procesem egzotermicznym. Występowanie obydwu tych zjawisk jest dobrze widoczne w przebiegu termicznej denaturacji albuminy w roztworze soli fizjologicznej, zilustrowanym na rys. 4. Przedstawione krzywe DSC uzyskano dla dwóch zbliżonych stężeń albuminy wołowej. Próbkę o wyższym stężeniu ogrzewano od 15°C do 95°C, natomiast tę o stężeniu niższym ogrzewano od 15°C do 75°C i następnie po schłodzeniu do temperatury 15°C ponownie ogrzewano od 15°C do 95°C. Zaraz za endotermicznym pikiem w zakresie temperatur 50–75°C, związanym z rozfałdowaniem łańcucha polipeptydowego makromolekuły białka, obserwowany jest pik egzotermiczny świadczący o zachodzącej agregacji.

Brak pików endotermicznych na krzywej uzyskanej w wyniku ponownego ogrzewania próbki, po jej uprzednim schłodzeniu do temperatury wyjściowej, wskazuje na nieodwracalność procesu termicznej denaturacji albuminy w roztworze soli fizjologicznej, gdy tymczasem w wodzie proces ten jest częściowo odwracalny (MICHNIK 2003; MICHNIK *et al.*, 2005 a, 2006 a).



Rys. 4. Krzywe DSC roztworu BSA w soli fizjologicznej otrzymane przy szybkości skanowania $0,67^{\circ}\text{C min}^{-1}$ i stężeniu białka $2,95 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (—) oraz $2,07 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (---) — pierwsze skanowanie (w zakresie temperatur 15–75°C), (.....) — drugie skanowanie (w zakresie temperatur 15–95°C) (opracowanie własne)

Jako podstawowe parametry przejścia wyznacza się najczęściej: temperaturę przejścia T_m (za T_m przyjęto w tej pracy temperaturę, dla której występuje maksimum nadmiarowej pojemności cieplnej, $\langle \Delta C_p \rangle$), zmianę entalpii ΔH (ΔH reprezentuje efekt cieplny procesu) oraz szerokość połówkową przejścia HHW (jego szerokość w połowie wysokości). Dyskusja tych parametrów oraz ich porównanie z danymi literaturowymi wymagają zawsze uwzględnienia zależności od wspomnianych na początku tego rozdziału czynników specyfikujących materiał badawczy oraz warunki doświadczalne.

W celu ogólnego wprowadzenia w tematykę termicznej denaturacji albuminy w tabeli 1 zestawiono charakterystyczne parametry przejścia ze stanu natywnego w zdenaturowany dla badanych rodzajów albuminy: wołowej nieodtłuszczonej (BSA) i odtłuszczonej (BSAf) oraz ludzkiej nieodtłuszczonej (HSA) i odtłuszczonej (HSAf) w zbliżonych warunkach doświadczalnych (MICHNIK, 2003; MICHNIK *et al.*, 2006 a). Dodatkowo zamieszczono wartości temperatur przejścia T_m i zmian entalpii ΔH dla ludzkiej hemoglobiny HbA₀ i methemoglobiny (mHb) (MICHNIK *et al.*, 2005 b), aby porównać termiczne właściwości albuminy i hemoglobiny — dwóch ważnych globularnych białek krwi, podobnych pod względem masy cząsteczkowej oraz pełnienia funkcji przENOŚNIKÓW, ale istotnie różniących się budową.

Tabela 1

Wartości średnich temperatur T_m i zmian entalpii ΔH (\pm błąd standardowy średniej) dla procesu termicznej denaturacji albuminy i hemoglobiny w roztworach wodnych, wyznaczone z pomiarów DSC wykonanych w zakresie stężeń białka $1,5 \cdot 10^{-5}$ — $4,5 \cdot 10^{-5}$ M, pH 5,5—6,5, przy szybkości skanowania 1°C min^{-1}

Parametry	Białko					
	hemoglobina ludzka		albumina			
			wołowa		ludzka	
	mHb	HbA ₀	BSA	BSAf	HSA	HSAf
$T_m / ^\circ\text{C}$	$61,8 \pm 0,4$	$69,0 \pm 0,5$	$66,2 \pm 0,5$	$56,9 \pm 0,9$	$80,7 \pm 0,4$	$62,0 \pm 0,8$
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	1048 ± 84	972 ± 80	745 ± 64	496 ± 17	1170 ± 48	908 ± 80

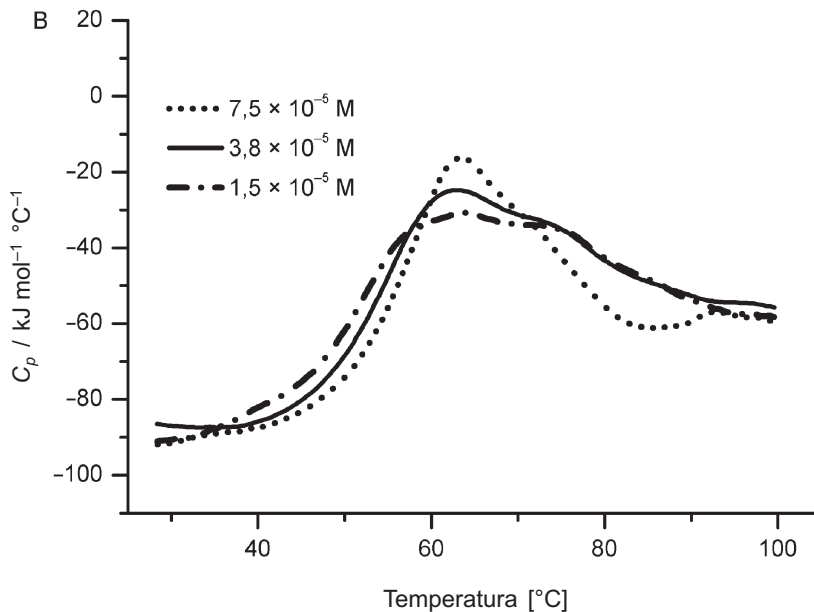
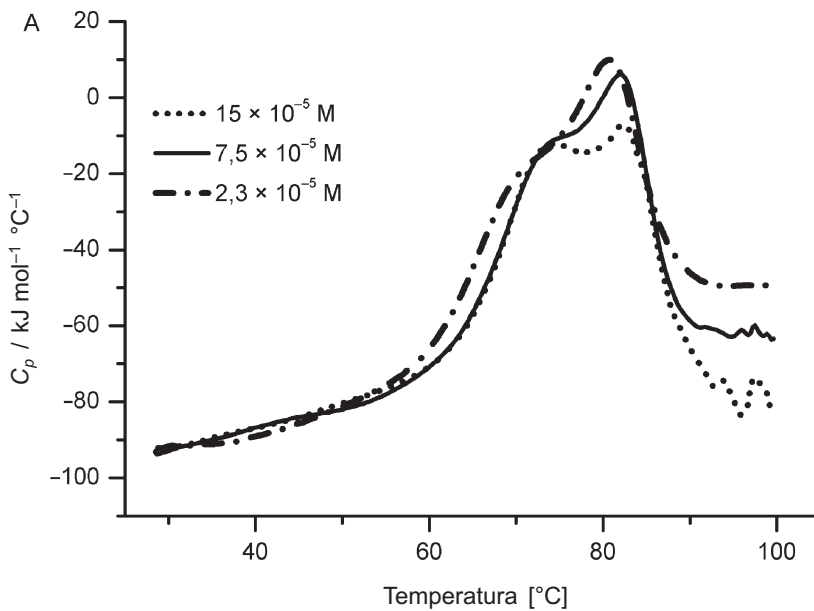
Jak wynika z tabeli 1, w wyszczególnionych warunkach doświadczalnych najniższymi wartościami T_m i ΔH charakteryzuje się albumina wołowa odtłuszczone, a najwyższymi albumina ludzka, która nie została pozbawiona endogennych kwasów tłuszczowych. Wartości T_m i ΔH dla badanych rodzajów hemoglobin mieszczą się w zakresie skrajnych wartości dla albumin. Porównywane parametry termicznego rozfałdowania białka są najbardziej zbliżone dla ludzkiej HbA₀ i BSA oraz dla ludzkiej mHb i HSAf. Informacje płynące z przedstawionych prostych porównań podstawowych parametrów przejścia dla badanych odmian albumin i hemoglobin w zbliżonych warunkach doświadczalnych mogą być użyteczne w pewnych zastosowaniach klinicznych (BLEUSTEIN *et al.*, 2000 a, b; Hu, Su, 2003; Lu *et al.*, 2005).

5.2. Specyfika termicznych przemian konformacyjnych albuminy ludzkiej i wołowej

Albuminy ssaków wykazują wiele podobieństw pod względem struktury i właściwości fizykochemicznych (PETERS, 1985; CARTER, HO, 1994; TUBIO *et al.*, 2004). W sekwencji aminokwasowej albumin różnych ssaków znajdują się 332 niezmiennicze reszty. Stanowią one około 57% wszystkich reszt aminokwasowych. Sekwencję albuminy ludzkiej i wołowej podał J.R. Brown w 1975 roku (BROWN, 1975; BEHRENS *et al.*, 1975), a niezależnie od niego sekwencję albuminy ludzkiej przedstawił B. Meloun (MELOUN *et al.*, 1975). Obydwie albuminy mają 76% identycznych sekwencji aminokwasowych. Cząsteczka HSA składa się z 585, a BSA z 582 reszt aminokwasowych o zbliżonej średniej wadze molekularnej (113,57 dla HSA i 113,86 dla BSA). Jednocześnie pomiędzy obydwoma albuminami występują istotne różnice, które ujawniają się np. w zachowaniu elektroforetycznym (MILLER, GEMEINER, 1993), termicznej i chemicznej trwałości (KOSA *et al.*, 1998 a), właściwościach wiążących i fotochemicznych (KOSA *et al.*, 1997, 1998 b; TAYYAB *et al.*, 2003). Inny jest wypadkowy ładunek molekuł (przy pH 7 równy -18 dla BSA i -15 dla HSA). W cząsteczce BSA znajdują się dwa tryptofany: Trp-134 ulokowany w domenie I i Trp-212 ulokowany w domenie II, natomiast w HSA znajduje się tylko jeden tryptofan — Trp-214 w domenie II. Trp-134 jest bardziej eksponowany na hydrofilowe środowisko, podczas gdy Trp-212 jest schowany w hydrofobowej pętli. Choć w wielu pracach eksperymentalnych albumina wołowa jest traktowana jako białko modelowe dla albuminy ludzkiej (m.in. ze względu na powszechniejszy dostęp i niższą cenę), to nie wszystkie wyniki uzyskane dla albuminy wołowej mogą być przełożone także na ludzką.

Dzięki znacznemu udoskonaleniu przyrządów DSC w ostatnim czasie badania mikrokalorymetryczne należą do tych, które umożliwiają poznanie specyfiki termicznych właściwości białek różnego pochodzenia w określonych warunkach środowiskowych, a także przemian, którym podlegają. W dostępnych pracach naukowych poświęconych porównawczym badaniom DSC albumin różnych ssaków wykazano istnienie różnic w charakterze przejść związanych z termiczną denaturacją tych białek oraz pomiędzy podstawowymi parametrami termodynamicznymi, które je opisują (KOSA *et al.*, 1998 a; BLEUSTEIN *et al.*, 2000 b; MICHNIK *et al.*, 2006 a).

Badania T. KOSY (1998) dotyczyły tylko albumin pozbawionych kwasów tłuszczowych, natomiast C.B. BLEUSTEIN (2000) oraz autorka niniejszej pracy badali albuminy odtłuszczone i nieodtłuszczone. Wiele prac poświęcono wyłącznie albuminie ludzkiej lub wołowej (GUMPEN *et al.*, 1979; ROSS *et al.*, 1984; YAMASAKI *et al.*, 1990; BARONE *et al.*, 1995; GIANCOLA *et al.*, 1997; PICO, 1997; TIKTOPULO *et al.*, 1985; ANRAKU *et al.*, 2007; MICHNIK *et al.*, 2003, 2005 a).



Rys. 5. Zależność krzywych DSC albuminy ludzkiej od jej stężenia w roztworze wodnym: A — HSA, B — HSAf (szybkość skanowania $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, pH $6,0\pm 0,5$) (MICHNIK, 2006 a)

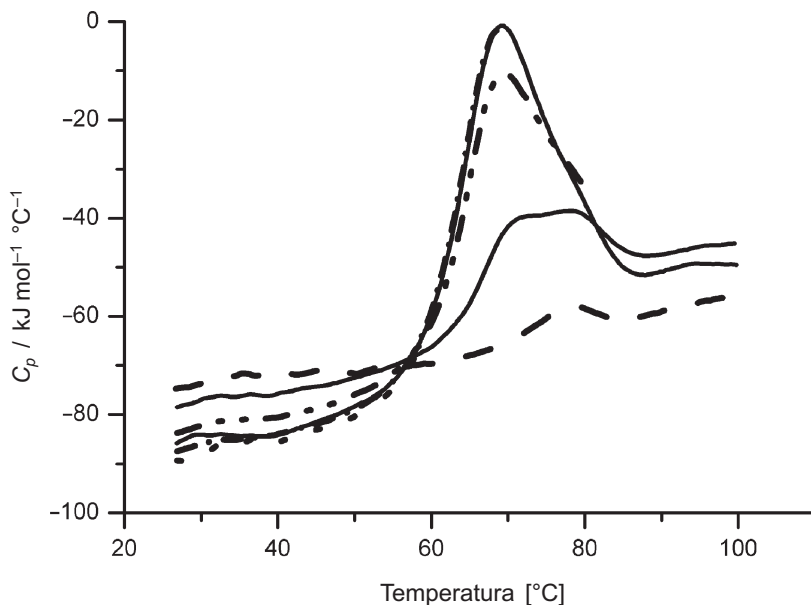
Podsumowując zgromadzone wyniki badań (MICHNIK, 2003; MICHNIK *et al.*, 2005 a, 2006 a), stwierdza się, że obrazem rozfałdowania albuminy w roztworach wodnych może być pojedynczy pik, pik z ramieniem lub pik z dwoma wy-

rażnymi składowymi, zależnie od rodzaju albuminy, obecności kwasów tłuszczowych, stężenia białka i w mniejszym stopniu od szybkości skanowania. Przy stężeniach białka w zakresie $1,5 \cdot 10^{-5}$ M— $4,5 \cdot 10^{-5}$ M, pH 5,5—7,0 i szybkościach skanowania $0,6$ — $1,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, dla albumin ludzkich obserwowano piki z ramieniem, dla albuminy wołowej nieodtłuszczonej był to pojedynczy pik, a dla odtłuszczonej przejście bimodalne (rys. 3 i 5). Opisane kształty krzywych DSC są zgodne z otrzymanymi przez M. YAMASAKI *et al.* (1990), a także (z wyjątkiem odtłuszczonej albuminy wołowej) przez C.B. BLEUSTEIN *et al.* (2000 b) pomimo znacznie większych stężeń badanych białek. Bardzo podobne wyniki uzyskał także E.I. TIKTOPULO w buforze fosforanowym o pH 7,0, przy stężeniach odpowiadających wskazanemu powyżej zakresowi i tych samych szybkościach skanowania (TIKTOPULO *et al.*, 1985).

Natomiast w roztworach 150 mM NaCl (pH 7,0) P.D. ROSS, A. SHRAKE otrzymali dla badanych albumin innego typu krzywe DSC (ROSS *et al.*, 1984; SHRAKE *et al.*, 1984). W tych warunkach znacznie różniących się siłą jonową termiczna denaturacja ludzkiej albuminy odtłuszczonej była reprezentowana przejściem jednomodalnym w całym badanym zakresie stężeń, od $1,4$ mg ml⁻¹ do 74 mg ml⁻¹, a albuminy nieodtłuszczonej — przejściem bimodalnym, w zakresie stężeń od $1,3$ mg ml⁻¹ do 64 mg ml⁻¹, przy szybkości skanowania $14,7^{\circ}\text{C h}^{-1}$. Bimodalność przejścia dla ludzkiej albuminy nieodtłuszczonej została zinterpretowana jako pochodząca od oddzielnego rozfałdowania dwóch frakcji albuminy: ubogiej i bogatej w kwasy tłuszczowe. Taka interpretacja nie pozwala jednak na wytłumaczenie bimodalności obserwowanej przez autorkę tej pracy (MICHNIK, 2003) oraz przez M. YAMASAKI *et al.* (1990) dla pozbawionej kwasów tłuszczowych albuminy wołowej w roztworach wodnych w pewnych, określonych przez pH i siłę jonową, warunkach. W świetle danych literaturowych nie jest jasne, czy źródłem bi- lub wielomodalności przejścia są różne frakcje molekuł, czy oddzielne rozfałdowanie różnych fragmentów (podjednostek) makromolekuły. Nie można wykluczyć, że obydwie sytuacje są możliwe i w efektach praktycznie nierozróżnialne.

Kalorymetryczna odwracalność przejścia jest badana zwykle na podstawie jego odtwarzalności w drugim przebiegu w tym samym zakresie temperatur, który realizowany jest po uprzednim schłodzeniu próbki do temperatury wyjściowej. Ze względu na to, że rozfałdowane molekuły białka wykazują często tendencję do agregacji, cały proces denaturacji staje się nieodwracalny, choć może być w dużym stopniu odwracalny w zakresie niższych temperatur, gdzie agregacja występuje tylko w niewielkim stopniu. Zaproponowano w związku z tym zmodyfikowany sposób badania odwracalności denaturacji białka (MICHNIK, 2003, 2007 b), zilustrowany na rys. 6 dla BSA. Określono w ten sposób odwracalność procesu w procentach przy jego zejściu do określonej temperatury.

W tabeli 2 porównano nieodtłuszczone i odtłuszczone albuminy ludzkie i wołowe pod względem odwracalności procesu termicznej denaturacji. Wynika



Rys. 6. Krzywe DSC dla BSA otrzymane w kolejnym ogrzewaniu roztworu białka do temperatur: 60°C (.....), 70°C (-.-.-.-), 80°C (-----), 100°C pierwszy raz (—), 100°C drugi raz (----) w porównaniu z jednorazowym ogrzewaniem do temperatury 100°C (—), (stężenie HSA — 0,0298 mM; pH 5,5; szybkość skanowania 1°C min⁻¹) (MICHNIK, 2003)

Tabela 2

Odwracalność ($\pm 3\%$) procesu denaturacji albumin wołowych i ludzkich po ich ogrzewaniu do określonych temperatur T / °C

T / °C	Odwracalność [%]			
	BSA	HSA	BSAf	HSAf
60	100	100	90	100
70	85	95	67	90
80	33	70	32	42
100	8	13	7	7

z niej, że lepszą odwracalnością charakteryzują się przejścia dla albumin ludzkich niż dla wołowych, a porównując formy odtłuszczone i zawierające kwasy tłuszczowe, odwracalność procesu jest lepsza dla tych drugich.

W badanych przez autorkę tej pracy warunkach doświadczalnych (tabela D1 w rozdziale D IV) białka te można uporządkować według temperatury przejścia T_m rosnąco: BSAf, HSAf, BSA, HSA. Większe wartości zmian entalpii dla albumin ludzkich w porównaniu z ich odpowiednikami albumin wołowych potwierdzają większą trwałość termiczną tych pierwszych. Podana relacja zgadza się z wynikami badań C.B. BLEUSTEINA *et al.*, (2000 b). Także T. KOSA *et al.* (1998 a) relacjonowali wyższą wartość T_m dla odtłuszczonej albuminy ludzkiej

w porównaniu z wołową. Przy pH 7,4, stężeniu białka 0,1 mM i szybkości skanowania $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ uzyskali oni dla albuminy ludzkiej i wołowej odpowiednio temperatury denaturacji: $59,7 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ i $56,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, zbliżone do temperatur przejścia: $62,5 \pm 0,8$ i $56,2 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$, uzyskanych przy tej samej szybkości skanowania dla podobnego stężenia albuminy i nieco niższego pH $\approx 6,0$ w ramach wyników badań autorki tej pracy. Różnica pomiędzy albuminą ludzką a wołową udokumentowana w badaniach A. MICHNIK *et al.* (2006) jest jednak większa niż znalezione maksymalne $2\text{--}3^{\circ}\text{C}$ różnice obserwowane przez T. KOSE *et al.* (1998 a) pomiędzy temperaturami przejścia albumin pięciu ssaków, różniących się więcej niż jedną resztą aminokwasową. Te odmienności pomiędzy ssakami są także zaskakująco małe, biorąc pod uwagę wyniki badań U. KRAGH-HANSEN *et al.* (2005), które wykazały, iż spośród 23 mutacji albuminy ze zmienioną pojedynczą resztą aminokwasową, w 13 przypadkach zmiany w temperaturach przejścia T_m były co do wartości bezwzględnej większe od 2°C .

Na podstawie dostępnych danych literaturowych nie można jednoznacznie stwierdzić, czy proces termicznego rozfałdowania albuminy może być traktowany jako dwustanowy. T. KOSA *et al.* (1998) uznali rozpatrywane przejście dla obydwu albumin (wołowej i ludzkiej) za pojedyncze dwustanowe. Opis ten odbiega od zaproponowanego przez C. GIANCOLE *et al.* (1997) dla termicznej denaturacji odtłuszczonej albuminy wołowej w podobnych warunkach, według którego na całkowity proces termicznej denaturacji składają się dwa przejścia dwustanowe. Autorka tego opracowania uzyskała dla albuminy wołowej odtłuszczonej, podobnie jak C. GIANCOLA *et al.*, dobre dopasowanie w modelu dwustanowym z dwoma niezależnymi przejściami (MICHNIK, 2003). Interpretacja wyników analizy dekonwolucyjnej dla badanych rodzajów albumin zostanie zrelacjonowana w dalszej części pracy. Wymaga ona przedyskutowania różnic między albuminami zawierającymi kwasy tłuszczowe i wolnymi od kwasów tłuszczowych.

5.3. Wpływ obecności kwasów tłuszczowych na charakter termicznego rozfałdowania albuminy

Jedną z ważnych funkcji albuminy jest transport kwasów tłuszczowych. Wiązanie niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych do albuminy może powodować istotne zmiany konformacyjne w molekuale albuminy (CARTER, HO, 1994, PETITPAS *et al.*, 2001; BHATTACHARAYA *et al.*, 2000; CURRY *et al.*, 1998, 1999). Zagadnienia wybrane z doniesień literaturowych, a dotyczące wiązania kwasów tłuszczowych do albuminy, omówiono w rozdziale D1 *Dodatku*.

Wpływ kwasów tłuszczowych na proces termicznej denaturacji albuminy jest jednym z zagadnień, którego wyjaśnienia poszukuje się z zastosowaniem techniki DSC (SHRAKE *et al.*, 1984; TIKTOPULO *et al.*, 1985; BLEUSTEIN *et al.*, 2000 b; MICHNIK *et al.*, 2003, 2006). Częściej badana kalorymetrycznie była odtłuszczona forma albuminy (YAMASAKI *et al.*, 1990; BARONE *et al.*, 1995; PICO, 1997; KOSA *et al.*, 1998 a; SHRAKE *et al.*, 1984; ANRAKU *et al.*, 2007). Z większości prac wynika, że jej termiczną denaturację w roztworach buforowych o pH około 7 (także w obecności NaCl) reprezentuje pojedynczy pik na krzywej DSC, niezależnie od gatunkowego pochodzenia białka, czy jest ono ludzkie, wołowe, wieprzowe, czy psie, jakkolwiek E.I. TIKTOPULO *et al.* (1985) zaobserwowali dla pozbawionej kwasów tłuszczowych albuminy ludzkiej w buforze fosforanowym o pH 7 pik z ramieniem. W roztworach wodnych, w określonych warunkach pH i siły jonowej, termiczne rozfałdowanie odtłuszczonej albuminy wołowej reprezentowane jest przejściem bimodalnym (YAMASAKI, 1990; MICHNIK, 2003), a ludzkiej pikiem z ramieniem (MICHNIK *et al.*, 2006 a). Jedyne dla bardzo dużych stężeń albuminy wołowej (50% ww.), przy których ze względu na występującą agregację proces był nieodwracalny, obserwowano w roztworach wodnych o niemodyfikowanej sile jonowej i pH — pojedynczy pik (BLEUSTEIN, 2000 b).

Przejścia związane z rozfałdowaniem albumin zawierających kwasy tłuszczowe obserwowano jako bimodalne (SHRAKE *et al.*, 1984) lub typu pik z ramieniem (TIKTOPULO *et al.*, 1985; MICHNIK *et al.*, 2006), z wyjątkiem albuminy wołowej BSA, dla której w roztworach wodnych zarejestrowano pojedynczy pik (BLEUSTEIN, 2000 b; MICHNIK, 2003).

Zarówno z badań doświadczalnych, jak i z prac teoretycznych wynika, że wiązanie ligandów do białka lub ich redystrybucja ze zmianą temperatury w trakcie pomiaru DSC może prowadzić do bimodalności przejścia (SHRAKE, ROSS, 1988, 1990; YAMASAKI, 1992; GIANCOLA *et al.*, 1997; COOPER, 2000). Podwójny pik lub pik z ramieniem, najczęściej obserwowane dla albumin nieodtłuszczonych, można w związku z tym wytłumaczyć redystrybucją kwasów tłuszczowych podczas ogrzewania roztworu albuminy. Bimodalny charakter denaturacji monomeru albuminy ludzkiej zawierającego 1,5 mola endogenicznych, długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, przypisano dwóm frakcjom albuminy: frakcji zawierającej niski poziom kwasów tłuszczowych — odpowiadającej za niskotemperaturową składową przejścia — oraz termicznie bardziej trwałej frakcji albuminy o wysokim poziomie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SHRAKE *et al.*, 1984; ROSS *et al.*, 1984). Taka interpretacja jest bardzo przekonująca. Pozostaje jednak problem uzasadnienia obserwacji niepasujących do tej koncepcji.

Jeśli z powodu braku obecności kwasów tłuszczowych w albuminie odtłuszczonej nie można wyjaśnić obserwowanej bimodalności przejścia (YAMASAKI *et al.*, 1990; MICHNIK, 2003) oddzielnymi etapami rozfałdowania

dwóch frakcji molekuł białka: ubogiej i bogatej w kwasy tłuszczowe, a z kolei dla nieodtłuszczonej albuminy wołowej pik będący obrazem jej rozfałdowania w roztworach wodnych jest wizualnie pojedynczy (BLEUSTEIN, 2000 a; MICHNIK, 2003), nasuwa się inny rodzaj interpretacji. Fakt, że w przypadku albuminy wołowej wolnej od kwasów tłuszczowych pewne zakresy pH i siły jonowej określają warunki, w których jej termiczne rozfałdowanie odzwierciedla się pikiem z ramieniem lub przejściem bimodalnym (YAMASAKI *et al.*, 1990), powiązано z występowaniem w tych warunkach szczeliny w sąsiedztwie Trp212, co prowadzi do podziału cząsteczki albuminy na dwie podjednostki. Pojawia się zatem koncepcja, że bimodalność przejścia odzwierciedla etapy termicznej denaturacji oddzielnych fragmentów molekuly białka, a nie dwóch różnych frakcji molekuł.

Choć proces termicznego rozfałdowania białek uważany jest za kooperatywny (JACKSON, 2006), w przypadku białek zbudowanych z kilku domen prawdopodobne jest wyodrębnienie się podjednostek widzianych oddzielnie w procesie denaturacji. Ze względu na nierozłączne zakresy temperatur, w których realizują się przejścia dla tych podjednostek, wkłady do całkowitego efektu cieplnego nakładają się, ale możliwe jest ich rozdzielanie przez dekonwolucję krzywych DSC.

5.4. Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC albuminy

Połączenie danych kalorymetrycznych z odpowiednim modelem pozwala uzyskać informację na poziomie molekularnym. Na podstawie badań DSC stwierdzono, że proces termicznego rozfałdowania albuminy, zarówno wołowej, jak i ludzkiej, jest częściowo odwracalny, zależny od stężenia białka i bardzo słabo zależny od szybkości skanowania (MICHNIK, 2003; MICHNIK *et al.*, 2006 a). Spełnienie kryteriów pozwalających na rozpatrywanie go w ramach termodynamiki równowagowej (SANCHEZ-RUIZ *et al.*, 1988, 1992) umożliwiło wykonanie analizy dekonwolucyjnej z zastosowaniem modeli opisanych w rozdziale 4 oraz specjalistycznego oprogramowania DSC MicroCal Origin. Analiza ta posłużyła do określenia charakteru zmian strukturalnych w procesie denaturacji.

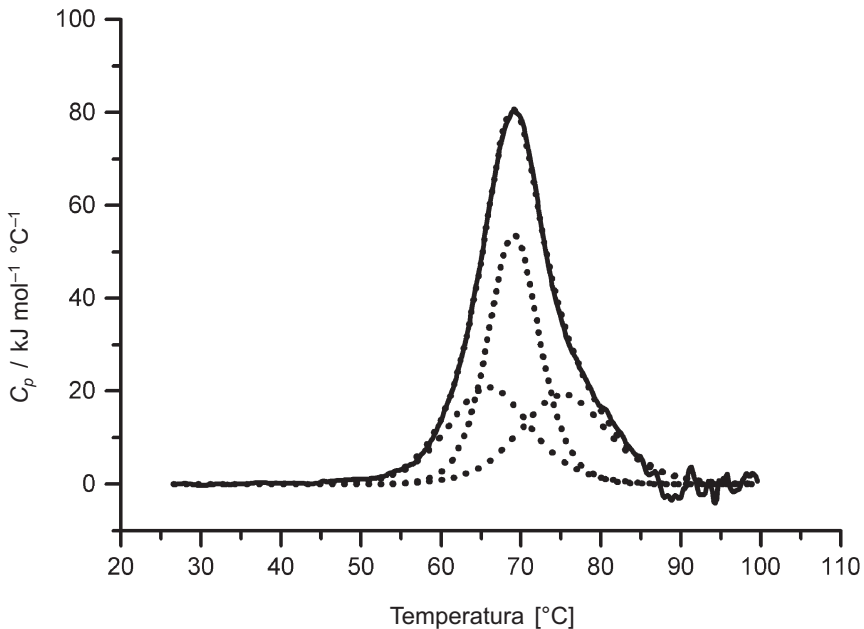
W doborze odpowiedniego modelu, dobrze opisującego dane doświadczalne, pomocne jest posłużenie się wartością stosunku entalpii kalorymetrycznej do entalpii van't Hoffa (omówionego w rozdziale 3.1), informującego o liczbie kooperatywnych podjednostek ujawniających się podczas przejścia. Zgodność entalpii kalorymetrycznej i van't Hoffa wskazuje na proces dwustanowy. Przedstawione w tabeli 3 wyniki analizy przejścia reprezentującego termiczne roz-

Tabela 3

Parametry termodynamiczne (\pm błąd standardowy średniej) uzyskane w ramach modelu niedwustanowego przy założeniu jednoskładnikowego przejścia termicznego rozkładania BSA

Stężenie / 10^{-5} M	T_m / °C	ΔH_{cal} / kJ mol $^{-1}$	ΔH_{vH} / kJ mol $^{-1}$	$\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$
2,9	69,4 \pm 0,9	934 \pm 71	263 \pm 10	3,55
4,4	70,1 \pm 0,5	989 \pm 134	303 \pm 24	3,26
7,4	70,9 \pm 0,7	1022 \pm 42	339 \pm 16	3,01

fałdowanie nieodtłuszczonej albuminy surowicy wołowej (BSA) w ramach modelu niedwustanowego (opisanego w rozdziale 4.2.3) sugerują istnienie trzech jednostek kooperatywnych na mol BSA. Hipotezę tę potwierdziła dobra jakość dopasowania krzywej DSC uzyskana w modelu dwustanowym z trzema niezależnymi przejściami i $\Delta C_p = 0$, co ilustruje rys. 7.



Rys. 7. Dopasowanie krzywej DSC wołowej albuminy nieodtłuszczonej w roztworze wodnym w ramach modelu dwustanowego z trzema przejściami niezależnymi, $\Delta C_p = 0$ (—) — krzywa doświadczalna, (.....) — wynik analizy dekonwolucyjnej (MICHNIK, 2003)

Przebieg procesu termicznej denaturacji BSA może być zatem powiązany z trójdomenową strukturą albuminy. Parametry trzech niezależnych przejść składowych uzyskane dla modelu dwustanowego zebrano w tabeli 4. Biorąc pod uwagę wielkość efektu cieplnego, wkład od poszczególnych domen, podążając w kierunku rosnącej temperatury przejścia, oszacowano na: 27%, 42%, 31% \pm 2% (MICHNIK, 2003).

Tabela 4

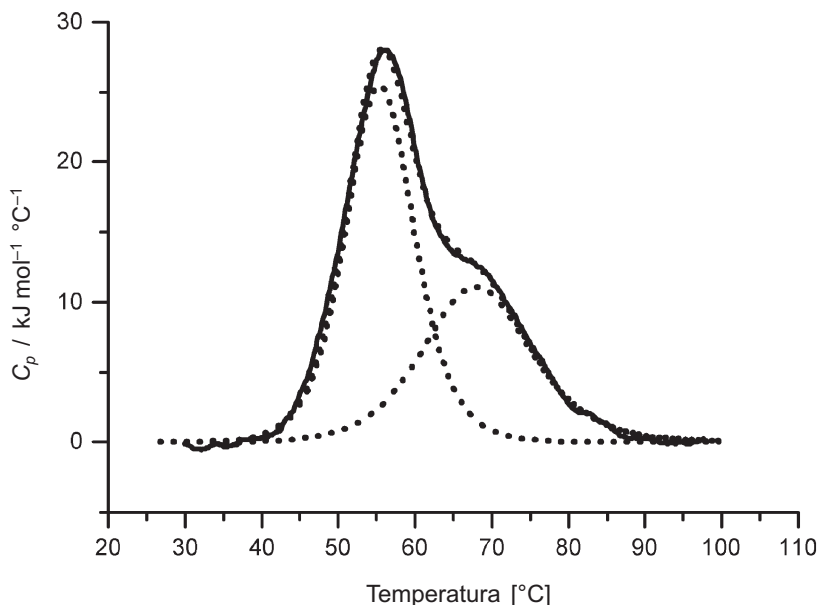
Parametry termodynamiczne (\pm błąd standardowy średniej) uzyskane w ramach modelu dwustanowego przy założeniu trzech niezależnych przejść składowych dla procesu termicznego rozkładowania BSA

Stężenie / 10^{-5} M	$T_1 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_1 / \text{kJ mol}^{-1}$	$T_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_2 / \text{kJ mol}^{-1}$	$T_3 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_3 / \text{kJ mol}^{-1}$
2,9	$65,7 \pm 1,2$	249 ± 14	$68,2 \pm 0,3$	396 ± 39	$75,0 \pm 0,5$	313 ± 13
4,4	$66,1 \pm 0,5$	283 ± 24	$69,5 \pm 0,7$	455 ± 30	$75,9 \pm 1,6$	300 ± 20
7,4	$66,4 \pm 0,9$	307 ± 36	$70,8 \pm 0,7$	469 ± 28	$76,7 \pm 1,1$	328 ± 14

Próba zastosowania modelu z przejściami sekwencyjnymi, opisanego w rozdziale 4.3, dała gorsze rezultaty w porównaniu z modelem zakładającym przejścia niezależne.

Przypisanie trzem przejściom składowym niezależnego rozkładowania trzech domen BSA znajduje uzasadnienie w udokumentowanych wcześniej przez innych autorów powiązaniach między danymi termodynamicznymi i strukturalnymi dla białek. Wykazano np. dobrą zgodność parametrów termodynamicznych otrzymanych w wyniku analizy dekonwolucyjnej przejścia DSC dla plasminogenu, z parametrami zmierzonymi w oddzielnych eksperymentach DSC dla jego proteolitycznych fragmentów (PRIVALOV, POTEKHIN, 1986). Także dla albuminy ludzkiej (w buforze fosforanowym, pH 7,0), temperatury i zmiany entalpii dwóch przejść przypisanych fragmentowi zawierającemu aminokwasy 198—585 dobrze odpowiadały parametrom tych przejść znalezionych na podstawie dekonwolucji piku DSC uzyskanego dla całej makromolekuły (ТИКОПУЛО *et al.*, 1985). Gorsza okazała się analogiczna zgodność uzyskanych przez tych autorów parametrów dla albuminy wołowej (odtłuszczonej), w przypadku której badano fragment złożony z sekwencji aminokwasów 198—581.

Dla albuminy wołowej odtłuszczonej, dla której obserwowane w roztworach wodnych przejście było bimodalne, zaproponowano model denaturacji uwzględniający rozpad cząsteczki na dwa niezależnie rozkładujące się fragmenty. Jak pokazano na rys. 8, dobre dopasowanie krzywej DSC uzyskano z zastosowaniem modelu dwustanowego z $\Delta C_p = 0$, zakładając obecność dwóch przejść składowych. Podobne pod względem jakości oraz wartości parametrów dopasowanie otrzymano w ramach modelu niedwustanowego z dwoma przejściami (tabela 5). Wyniki analizy dekonwolucyjnej wykazały 66% i 34% udział odpowiednio nisko- i wysokotemperaturowego przejścia w całkowitej zmianie entalpii procesu (MICHNIK, 2003). Przyjmując, że Trp212 stanowi miejsce podziału cząsteczki na dwie podjednostki (co sugeruje hipoteza M. YAMASAKI *et al.* (1990) o występowaniu szczeliny w pobliżu Trp212), z których jedna składa się z 370, a druga z 212 aminokwasów, można wnioskować, że udział tych fragmentów w ogólnej liczbie (582) aminokwasów cząsteczki BSA_f wynosi 64% i 36%. Dobra korelacja pomiędzy wymienionymi udziałami procentowymi ami-



Rys. 8. Dopasowanie krzywej DSC wołowej albuminy odtuszczonej w roztworze wodnym w ramach modelu dwustanowego z dwoma przejściami niezależnymi, $\Delta C_p = 0$; (—) — krzywa doświadczalna, (.....) — wynik analizy dekonwolucyjnej (MICHNIK, 2003)

Tabela 5

Parametry termodynamiczne (\pm błąd standardowy średniej) uzyskane w ramach modelu niedwustanowego przy założeniu dwóch przejść składowych dla procesu termicznego rozkładania BSAf (stężenie białka $7,4 \cdot 10^{-5}$ M) (MICHNIK, 2003)

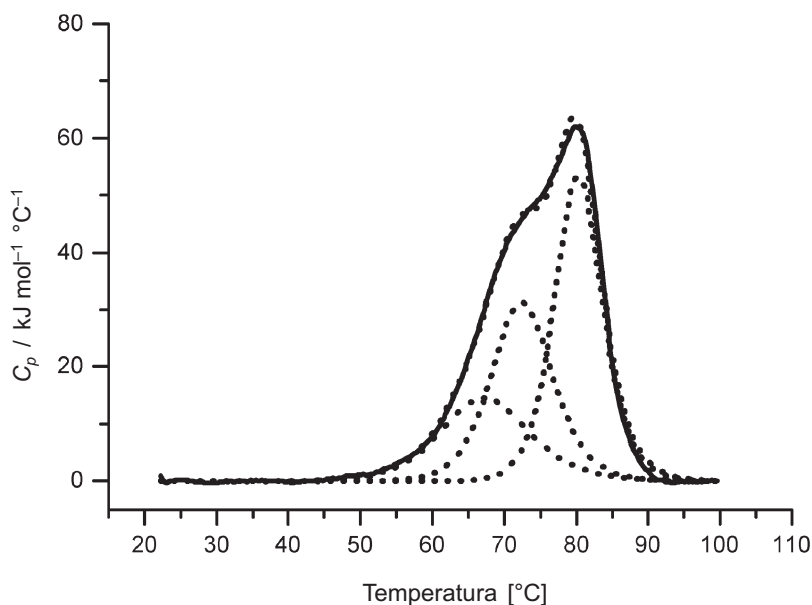
$T_1 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal,1} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_{vH,1} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_{cal,1} / \Delta H_{vH,1}$	$T_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal,2} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_{vH,2} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_{cal,2} / \Delta H_{vH,2}$
$55,8 \pm 0,5$	346 ± 18	277 ± 16	1,25	$69,6 \pm 0,6$	176 ± 18	236 ± 20	0,75

nokwasów budujących podjednostki a efektami cieplnymi przypisanymi przejściami składowym wskazuje na wyodrębnienie dwóch jednostek strukturalnych podczas termicznego rozkładania cząsteczki BSAf.

Denaturacja odtuszczonej albuminy przebiega zatem w dwóch etapach. Wskazany podział sugeruje, że najpierw następuje rozkładanie C-fragmentu, zawierającego domenę III i większą część domeny II, a następnie w wyższych temperaturach N-fragmentu, zawierającego domenę I i mniejszą część domeny II. Ten wniosek różni się od zaproponowanego przez C. GIANCOLE *et al.* (1997), że niskotemperaturowe przejście dla odtuszczonej albuminy odpowiada kolapsowi domeny I, a wysokotemperaturowe — podjednostki złożonej z domen II i III. Obydwie sugestie, choć z pozoru sprzeczne, mogą być jednak prawdziwe, ponieważ badania prowadzono w innych warunkach doświadczalnych (w pracy

GIANCOLI *et al.* w 0,01 M buforze fosforanowym pH 7, w obecności 0,15 M NaCl, a w pracy A. Michnik w roztworach wodnych o niższym pH (5,5—6,0) i niższym stężeniu białka), a jak wskazują rozważania przeprowadzone w dalszej części tej pracy, w rozdziale 6.1, podział cząsteczki albuminy na strukturalne podjednostki w procesie termicznej denaturacji uwarunkowany jest np. wartościami pH roztworu.

Opracowanie krzywych DSC dla albuminy ludzkiej zarówno odtłuszczonej, jak i nieodtłuszczonej pozwoliło stwierdzić, że stosunek entalpii kalorymetrycznej do entalpii van't Hoffa wynosi około 5—6, wskazując na większą niż 3 liczbę kooperatywnych podjednostek przy ich termicznym rozkładowaniu. Jednakże już przy założeniu trzech niezależnych przejść składowych w zastosowanym modelu dwustanowym z $\Delta C_p = 0$ uzyskano satysfakcjonujące rezultaty (rys. 9) (MICHNIK *et al.*, 2007 b, 2008). Wyniki dla obydwu albumin ludzkich



Rys. 9. Dopasowanie krzywej DSC ludzkiej albuminy nieodtłuszczonej w roztworze wodnym w ramach modelu dwustanowego z trzema przejściami niezależnymi, $\Delta C_p = 0$; (—) — krzywa doświadczalna, (.....) — wynik analizy dekonwolucyjnej (opracowanie własne)

zestawiono w tabeli 6. Sugestia o występowaniu trzech strukturalnych podjednostek w procesie termicznej denaturacji albuminy ludzkiej jest zgodna z propozycjami innych autorów (ТИКОПУЛО *et al.*, 1985; STOKKUM *et al.*, 1995).

Jeśli tak jak dla BSA, przypisać wyodrębnione przejścia składowe rozkładowaniu poszczególnych domen, dla albuminy ludzkiej nieodtłuszczonej proporcje pomiędzy wkładami efektów cieplnych są nieco inne niż dla BSA. Dla składo-

Tabela 6

Parametry termodynamiczne (\pm odchylenie standardowe) uzyskane w ramach modelu dwustanowego przy założeniu trzech niezależnych przejść składowych dla procesu termicznego rozfałdowania albumin ludzkich (stężenie białka $2,25 \cdot 10^{-5}$ M)

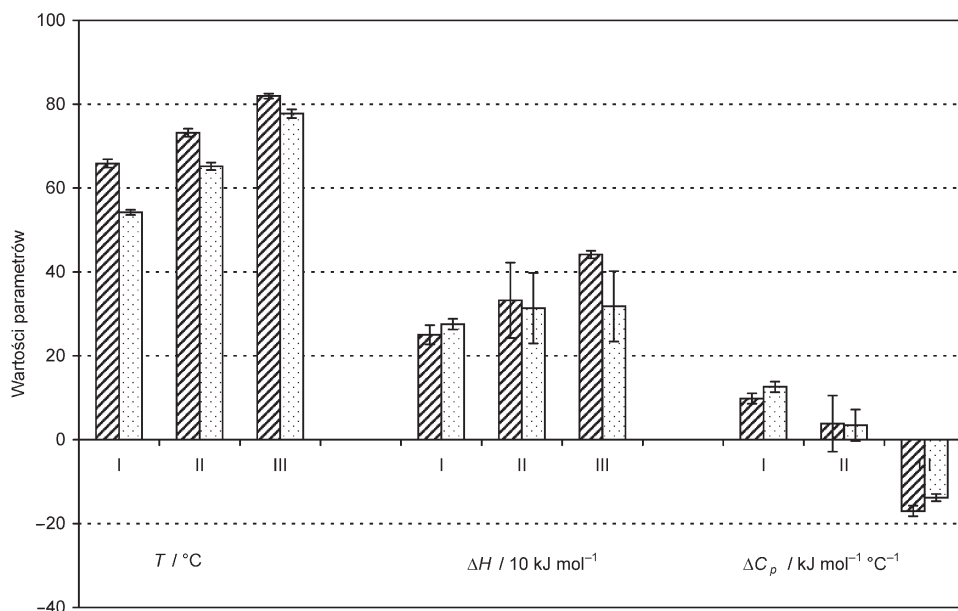
Albumina	$T_1 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_1 / \text{kJ mol}^{-1}$	$T_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_2 / \text{kJ mol}^{-1}$	$T_3 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_3 / \text{kJ mol}^{-1}$
HSA	$66,0 \pm 1,4$	253 ± 43	$72,1 \pm 0,5$	374 ± 38	$79,8 \pm 0,4$	456 ± 36
HSAf	$55,0 \pm 1,0$	313 ± 29	$64,3 \pm 1,3$	333 ± 32	$71,9 \pm 1,3$	347 ± 48

wych uporządkowanych według rosnącej temperatury przejścia wkładają te wynoszą: 23, 35, $42 \pm 5\%$, występuje zatem zamiana wielkości efektów cieplnych związanych z domenami, których rozfałdowanie zachodzi w zakresie wyższych temperatur. W przypadku albuminy ludzkiej odtłuszczonej wkłady od poszczególnych podjednostek są bardzo podobne, ich udziały to: 32%, 33%, $35\% \pm 5\%$ całkowitego efektu cieplnego. Te proporcje określone dla roztworów wodnych albuminy są nieco inne niż wynikające z wartości zmian entalpii wyznaczonych przez E.I. TIKTOPULĘ *et al.* (1985) w buforze fosforanowym o pH 7 dla trzech kolejnych przejść składowych: 377, 303, 327 kJ mol^{-1} , ale same wartości tych zmian entalpii w roztworach wodnych są zbliżone: 313, 333, 347 kJ mol^{-1} , a całkowity efekt cieplny bardzo podobny: 993 kJ mol^{-1} ($\pm 50 \text{ kJ mol}^{-1}$) w roztworach wodnych (MICHNIK *et al.*, 2008) i 1007 kJ mol^{-1} w 10 mM buforze fosforanowym oraz 975 kJ mol^{-1} w tym samym buforze, ale z dodatkiem 30 mM NaCl (TIKTOPULO *et al.*, 1985).

Znacznie lepsze dopasowania krzywych DSC albuminy ludzkiej otrzymano w modelu dwustanowym z trzema przejściami składowymi, ale uwzględniającym efekty ΔC_p (MICHNIK *et al.*, 2007 b, 2008). Wartości parametrów uzyskane w ramach modelu z $\Delta C_p \neq 0$ dla obydwu surowiczych albumin ludzkich: HSA i HSAf, zilustrowano na rys. 10.

Zastosowanie modelu z $\Delta C_p \neq 0$ daje dodatkowe informacje na temat zmian pojemności cieplnej w każdym ze składowych procesów zachodzących w trakcie przejścia. Znajomość zmian pojemności cieplnej przy rozfałdowaniu białka ułatwia wnioskowanie dotyczące zmian w dostępności polarnych i niepolarnych reszt aminokwasowych na działanie wodnego rozpuszczalnika (LADBURY, CHOWDHRY, 1998; LOLADZE *et al.*, 2001).

Pomiędzy odpowiednimi parametrami przejść (T_{mi} , ΔH_i , $i = 1, 2, 3$) użytymi w obydwu modelach dwustanowych (z $\Delta C_p = 0$ i z $\Delta C_p \neq 0$) nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Zarówno dla odtłuszczonej, jak i nieodtłuszczonej albuminy otrzymano dodatnią zmianę pojemności cieplnej w dwóch pierwszych przejściach i ujemną dla trzeciego, wysokotemperaturowego. Jak wynika z doniesień literaturowych, dodatnia zmiana pojemności cieplnej jest związana z hydratacją molekuł niepolarnych, a ujemna z transferem molekuł polarnych do wody (rozpuszczaniem grup polarnych w wodzie) (DILL, 1990;



Rys. 10. Parametry (T_m , ΔH , ΔC_p) dopasowania krzywych DSC dla HSA (słupki kreskowane) i HSAf (słupki kropkowane) w modelu dwustanowym z trzema przejściami (I, II, III), $\Delta C_p \neq 0$ (opracowanie własne)

MURPHY *et al.*, 1990, 1991; LOLADZE *et al.*, 2001). Także agregacja białka może być odpowiedzialna za ujemną wartość ΔC_p .

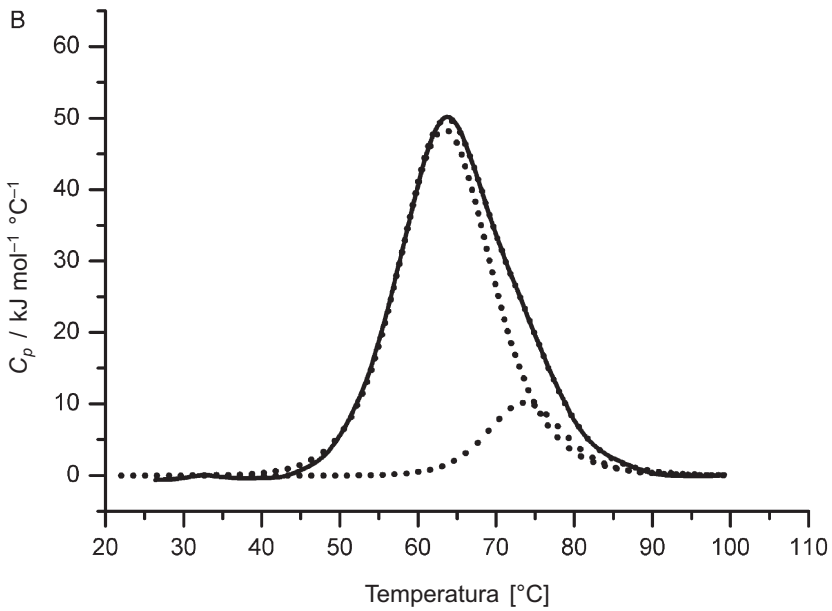
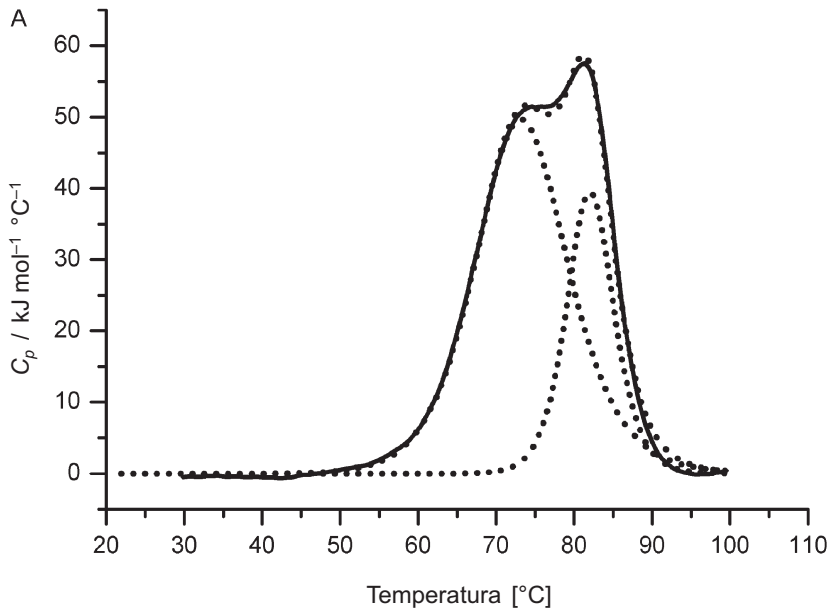
Rozważając model niedwustanowy, dobre dopasowanie pików termicznej denaturacji HSA oraz HSAf otrzymano już z uwzględnieniem dwóch przejść składowych (MICHNIK *et al.*, 2006 a), co ilustruje rys. 11. Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 7, stosunek entalpii kalorymetrycznej do entalpii van't

Tabela 7

Parametry termodynamiczne (\pm błąd standardowy średniej) uzyskane w ramach modelu niedwustanowego przy założeniu dwóch przejść składowych dla procesu termicznego rozkładania HSA i HSAf (stężenie białka $7,5 \cdot 10^{-5}$ M) (MICHNIK *et al.*, 2006 a)

Albumina	$T_1 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal,1} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_{vH,1} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_{cal,1} / \Delta H_{vH,1}$	$T_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal,2} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_{vH,2} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_{cal,2} / \Delta H_{vH,2}$
HSA	$73,4 \pm 0,2$	761 ± 20	265 ± 5	2,9	$82,2 \pm 0,2$	263 ± 31	613 ± 26	0,4
HSAf	$62,5 \pm 0,3$	760 ± 14	251 ± 5	3,0	$71,9 \pm 0,6$	83 ± 15	511 ± 53	0,2

Hoffa dla przejścia zachodzącego w niższej temperaturze wynosi około 3, sugerując 3 podjednostki kooperatywne uczestniczące w przejściu. Natomiast dla przejścia w wyższej temperaturze jest on mniejszy od 1, sugerując przejście nieodwracalne. Wyniki te przemawiają za poprawnością podejścia, w którym rozważa się trzy strukturalne jednostki przy rozkładaniu albuminy ludzkiej, ale



Rys. 11. Dopasowanie krzywych DSC albumin: A — HSA oraz B — HSAf w ramach modelu niedwustanowego z dwoma przejściami; (—) — krzywa doświadczalna, (.....) — wynik analizy dekonwolucyjnej (MICHNIK *et al.*, 2006 a)

wskazują też na występowanie efektu zakłócającego, związanego z nieodwracalną przemianą pewnej frakcji, czy fragmentów makromolekuł.

Podsumowując uzyskane wyniki analiz procesu termicznej denaturacji albumin w roztworach wodnych (MICHNIK, 2003; MICHNIK *et al.*, 2005 a, 2006 a, 2007 b, 2008), można stwierdzić, że w ustalonych warunkach eksperymentalnych przebiegi przemian konformacyjnych albuminy są charakterystyczne dla różnych jej rodzajów (ludzka, wołowe) oraz form (odtłuszczona i nieodtłuszczona). Wyznaczone parametry termodynamiczne przejść wskazały mniejszą trwałość termiczną albumin pozbawionych kwasów tłuszczowych, potwierdzając ochronny wpływ tych kwasów na trwałość struktury białka. Spełnienie kryteriów dopuszczających możliwość rozważania termicznego rozfałdowania albuminy w ramach termodynamiki równowagowej pozwoliło na przeprowadzenie analizy dekonwolucyjnej przejścia DSC odzwierciedlającego ten proces. Należy podkreślić, że w innych warunkach środowiskowych, w których omawiany proces byłby nieodwracalny (np. w roztworze soli fizjologicznej) i zależny od szybkości skanowania, podejście równowagowe nie byłoby możliwe. Przykładem białka, dla którego analiza procesu termicznej denaturacji w roztworach wodnych wymagała uwzględnienia efektów kinetycznych, jest hemoglobina. Ze względu na słabą odwracalność przejścia reprezentującego ten proces oraz jego zależność od szybkości skanowania zastosowano w tym przypadku modele omówione w rozdziale 3.2, łączące etapy równowagowe i kinetyczne (MICHNIK *et al.*, 2005 b).

Zgodnie z przeprowadzoną w ramach wybranych modeli analizą dekonwolucyjną przejścia związanego z procesem termicznej denaturacji albuminy w niemodyfikowanych roztworach wodnych, można wnioskować, że:

- rozfałdowanie albuminy wołowej odtłuszczonej obejmuje dwa zasadnicze etapy: rozfałdowanie C-końcowego fragmentu molekuly, zawierającego domenę III oraz większą część domeny II, a następnie rozfałdowanie N-końcowego fragmentu, utworzonego przez domenę I oraz mniejszą część domeny II;
- w procesie rozfałdowania albuminy wołowej nieodtłuszczonej oraz obydwu albumin ludzkich ujawniają się trzy kooperatywne podjednostki.

Rozfałdowaniu najmniej trwałej termicznie podjednostki albuminy ludzkiej (odtłuszczonej i nieodtłuszczonej) towarzyszy dodatnia zmiana pojemności cieplnej, wskazująca na dominację efektów związanych z odsłanianiem grup niepolarnych. Przy rozfałdowaniu drugiej podjednostki wartość ΔC_p jest także dodatnia, ale bardzo mała, w granicach błędu równa zero. Rozfałdowanie trzeciej podjednostki przebiega z ujemną zmianą pojemności cieplnej, sugerując przewagę wkładów pochodzących od odsłaniania grup polarnych lub występowanie zjawiska agregacji.

6. Termiczna denaturacja albuminy surowicy w roztworach wodnych modyfikowanych wybranymi czynnikami chemicznymi

6.1. Przemiany BSA w roztworach o pH w zakresie 3,5–7,0

Wartość pH, podobnie jak temperatura, wpływa na stan białka i trwałość jego konformacji. Zmiany pH powodują modyfikację sieci wiązań wodorowych, lokalne zmiany konformacyjne mające związek z protonacją i deprotonacją, ulegających tym zjawiskom grup w białku, np. histydyny (YANG, JR, 1996). Białka często są stabilne tylko w wąskim zakresie pH. W przypadku ekstremalnych wartości pH, dalekich od pI danego białka, wzrasta elektrostatyczne odpychanie pomiędzy podobnymi ładunkami i białko wykazuje tendencję do rozfałdowania (DILL, 1990; WANG, 1999). Następuje zmiana struktury trzeciorzędowej, cząsteczka przyjmuje strukturę przestrzenną bardziej rozciągniętą w stosunku do natywnej (BASOWA *et al.*, 2002). Denaturacja białek w ekstremalnych wartościach pH często prowadzi do znaczących zmian struktury drugorzędowej (KADI *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2007; DOCKAL *et al.*, 2000 a). Indukowana zmianami pH denaturacja białek może być zjawiskiem odwracalnym. Zmiany pH mocno wpływają jednakże na szybkość agregacji białek. Występowanie zjawiska agregacji prowadzi natomiast do nieodwracalności procesu denaturacji.

W zależności od pH roztworu albumina występuje w różnych formach izomerycznych, co zostało opisane przez Fostera w pracach z lat 1960, 1977, a następnie potwierdzone badaniami prowadzonymi różnymi technikami (PETERS, 1985; SADLER, DRUCKER, 1993; DOCKAL *et al.*, 2000 a; KADI *et al.*, 2006).

	E <----->	F <----->	N <----->	B <----->	A
pH przejścia:	2,7	4,3	8	10	
nazwa:	Expanded	Fast	Normal	Basic	Aged
	rozciągnięta	szybka	normalna	zasadowa	zestarzała
% α -helisy:	35	45	55	48	48

Izomeryczne formy albuminy surowicy wołowej (PETERS, 1985)

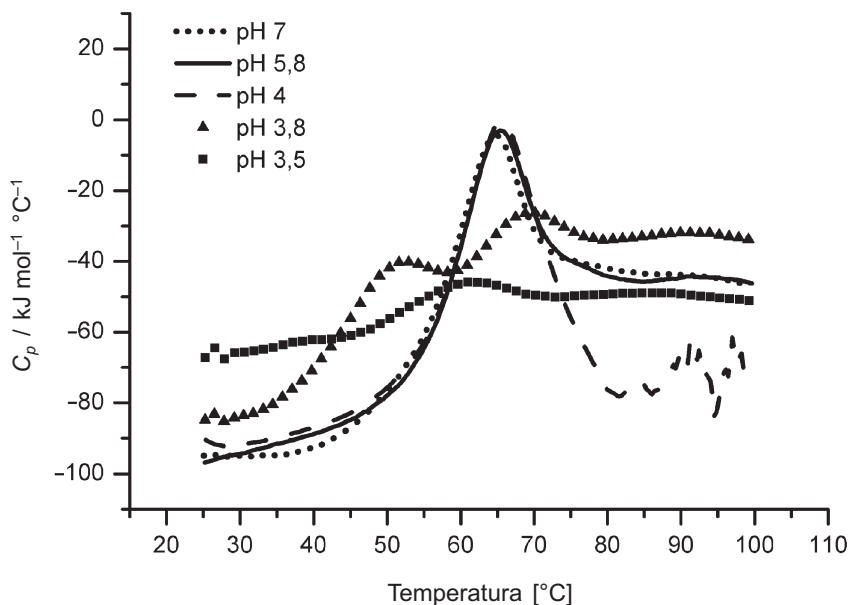
Początkowo uważano, że przy przejściu N→F następuje rozfałdowanie domeny III (KHAN, 1986). Późniejsze badania metodą ¹H NMR pokazały, że zmiany nie dotyczą wyłącznie domeny III, ale poniżej pH 4,5 występuje też rozfałdowanie w regionie N-końca (SADLER, DRUCKER, 1993). Z kolejnych, nowszych prac, prowadzonych metodami: dichroizmu kołowego (CD) i fluorescencji (DOCKAL *et al.*, 2000 a) wywnioskowano, że przy przejściu N→F ma miejsce rozluźnienie struktury głównie domeny III HSA oraz, że domena I ulega strukturalnej reorganizacji z niewielkimi zmianami w strukturze drugorzędowej, podczas gdy domena II przekształca się w stan podobny do tzw. molten-globuli. Forma F charakteryzuje się dramatycznym wzrostem lepkości, znacznie mniejszą rozpuszczalnością i znaczącą utratą zawartości struktury α -helikalnej. Interesującym zjawiskiem, zaobserwowanym przy obniżaniu pH od 7 do 4 jest stopniowy wzrost ściśliwości BSA (KADI *et al.*, 2006). Natomiast ze spadkiem pH od 3 do 2 następuje zmniejszanie się adiabatycznej ściśliwości. Rozciągnięta forma E ma zwiększoną lepkość wewnętrzną i zwiększony hydrodynamiczny stosunek osi.

Podwyższenie pH z 7 do 9 powoduje ekspansję molekuly (ZUNSHAIN *et al.*, 2003 a), albumina zmienia konformację i przyjmuje formę zasadową (B). W formie B silniejsze stają się fluktuacje głównego łańcucha albuminy, zmniejsza się jej konformacyjna stabilność i termiczna trwałość (KOSA *et al.*, 1998 b). Przy przejściu N→B domeny I i II ulegają izomeryzacji struktury trzeciorzędowej, podczas gdy dla domeny III nie zaobserwowano żadnych zmian w jej strukturze trzeciorzędowej (DOCKAL *et al.*, 2000 a). Jeśli roztwór albuminy jest przechowywany w pH 9, przy niskiej sile jonowej w temperaturze 3°C przez 3—4 dni, zachodzi izomeryzacja do formy A.

Doniesienia literaturowe na temat badań wpływu pH na albuminę surowicy techniką DSC dotyczą głównie jej formy odtuszczonej (TIKTOPULO *et al.*, 1985; BARONE *et al.*, 1992, 1995; GIANCOLA *et al.*, 1997; KOSA *et al.*, 1998 b; YAMASAKI *et al.*, 1990). Albumina krążąca w organizmie w warunkach fizjologicznych zawiera zwykle kwasy tłuszczowe, przeciętnie 1—2 cząsteczki na mol białka. Autorka tej pracy zbadała zależności krzywych DSC albuminy, zawie-

rającej fizjologiczne ilości kwasów tłuszczowych, od pH roztworu (MICHNIK *et al.*, 2005 a). Najważniejszymi kwasami tłuszczowymi związanymi z albuminą są: kwas palmitynowy, stearynowy, oleinowy, linolowy. Łącznie stanowią one około 86% wszystkich kwasów tłuszczowych przyłączonych do albuminy (NIELSEN *et al.*, 1997). S. CURRY *et al.* (1999) zasugerowali, że w warunkach fizjologicznych najbardziej prawdopodobnym z siedmiu miejsc wiążących kwasy tłuszczowe (omówionych w rozdziale D I *Dodatku*) jest to ulokowane w subdomenie IIIB.

Przebieg procesu termicznego rozkładowania albuminy nieodtłuszczonej w roztworach o wartościach pH od 7,0 do 3,5 zbadano dla dwóch stężeń albuminy: $c_1 = 0,022$ mM i $c_2 = 0,044$ mM (MICHNIK *et al.*, 2005a). Stwierdzono wyraźny wpływ pH zarówno na kształt krzywej DSC, jak i na wartości parametrów opisujących obserwowane przejście oraz zależność efektu pH od stężenia albuminy. Jak ilustruje rys. 12, w zakresie pH od 5,5 do 7,0 krzywe DSC albuminy są bardzo podobne i charakteryzują się pojedynczym przejściem endotermicznym. Przy obniżaniu wartości pH do około 4 obserwuje się „poszarpanie” fragmentu krzywej DSC odpowiadającego końcowemu zakresowi temperatur śledzonego przejścia, świadczące o wytrącaniu się białka i towarzyszącej rozkładowaniu agregacji. Przy dalszym obniżaniu pH, poniżej wartości 4, przejście staje się bimodalne, przy czym bimodalność ta pojawia się nieco wcześniej (przy pH 3,8) w przypadku roztworu albuminy o niższym stężeniu. Dla albumi-



Rys. 12. Wpływ pH na krzywe DSC albuminy surowicy wołowej BSA; stężenie 0,022 mM; szybkość skanowania $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (MICHNIK *et al.*, 2005)

ny o wyższym stężeniu bimodalność ujawniła się przy pH 3,5, kiedy to przejście dla albuminy o niższym stężeniu uległo dalszym znacznym modyfikacjom (mały pojedynczy pik pokazany na rys. 12), wskazując, że zmiany związane z obniżaniem wartości pH zachodzą szybciej w roztworach o niższym stężeniu białka.

Zależność przebiegu procesu termicznej denaturacji albuminy od pH roztworu została potwierdzona wyznaczonymi parametrami przejścia: T_m , ΔH oraz HHW. Najwyższe i jednocześnie zbliżone temperatury przejścia stwierdzono w warunkach pH 4,0 i 5,8. Pozostałe wartości T_m były znacząco niższe, a różnice między nimi istotne statystycznie. Rozpiętość wartości T_m w badanym zakresie pH (3,5—7,0) dla BSA o wyższym stężeniu to: $67,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (pH = 4,0) do $52,7 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (pH = 3,5). Temperatury denaturacji BSA w roztworach o dwa razy niższym stężeniu były o około $2,5^\circ\text{C}$ niższe. Największą wartością entalpii denaturacji charakteryzowało się przejście przy pH 4,0, a najmniejszą przy pH 3,5. Z wyjątkiem zmian entalpii w warunkach pH 5,8 oraz 7,0 wszystkie pozostałe wartości ΔH istotnie różniły się między sobą. Stwierdzono statystycznie istotną różnicę między szerokością przejścia w roztworach o niskim i wysokim stężeniu BSA przy pH 4,0 (pierwsza z wartości HHW większa).

Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe, porównania uzyskanych parametrów przejścia z danymi literaturowymi można dokonać dla pH 7,0. Wartości otrzymane przez A. MICHNIK *et al.* (2005 a): $T_m = 63,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$, $\Delta H = 708 \text{ kJ mol}^{-1}$ dla stężenia BSA 0,022 mM i $T_m = 66,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$, $\Delta H = 745 \text{ kJ mol}^{-1}$ dla stężenia 0,044 mM są zbliżone, choć nieco niższe od otrzymanych przez F. ZHANG *et al.* (1999) w podobnych warunkach eksperymentalnych, ale w buforze fosforanowym: $T_m = 67,6^\circ\text{C}$, $\Delta H = 213 \text{ kcal mol}^{-1} = 893 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Aby uzyskać więcej informacji na temat przebiegu procesu termicznego rozfałdowania albuminy w roztworach różniących się pH, przeprowadzono analizę dekonwolucyjną krzywych DSC. Na podstawie przeprowadzonych badań odwracalności przejścia w roztworach o pH 7 i 4 oraz zależności jego parametrów od szybkości skanowania podjęto decyzję o analizie w ramach termodynamiki równowagowej. Stężeniowa zależność rozpatrywanego procesu sugerowała występowanie równowagi asocjacyjno-dysocjacyjnej. Jednakże próby zastosowania modelu dwustanowego uwzględniającego dysocjację cząsteczki na n podjednostek (opisanego w rozdziale 4.4): $N_n \leftrightarrow nU$, gdzie N i U są odpowiednio stanami: natywnym i rozfałdowanym, nie dały satysfakcjonujących wyników. Najlepsze dopasowania do danych doświadczalnych uzyskano dla $2,6 < n < 3,8$, ale ogólnie jakość dopasowania nie była dobra, charakteryzowała się dużą wartością χ^2 .

Rezygnując z modelu uwzględniającego dysocjację, zastosowano wcześniej sprawdzony dla BSA w roztworze wodnym w zakresie wartości pH 5,5—6,5 (rozdział 5) model dwustanowy, zakładający istnienie trzech przejść składowych. Model ten pozwolił uzyskać dobre dopasowania krzywych DSC w zakresie wartości pH 5—7, ale nie był odpowiedni dla zakresu niskich wartości pH.

Ostatecznie porównanie charakterystyk przejścia w całym analizowanym zakresie pH umożliwiły modele niedwustanowe: z dwoma i trzema przejściami składowymi. W przypadku danych DSC dla wyższego z badanych stężeń albuminy dopasowanie krzywych przy założeniu trzech przejść składowych charakteryzowało się znacznie lepszą jakością niż z uwzględnieniem dwóch przejść.

Na podstawie wyników uzyskanych z modelu zakładającego dwa przejścia składowe wywnioskowano, że parametry przejścia realizowanego w zakresie niższych temperatur (nazywanego pierwszym) zmieniają się w sposób istotny wtedy, gdy staje się ono bimodalne. Poniżej odpowiadającej tym warunkom wartości pH zarówno temperatura, jak i entalpia przejścia maleją. Temperatura drugiego przejścia wykazuje natomiast dość zaskakującą tendencję. Ze wzrostem pH od 3,5 do 7,0 zaobserwowano spadek T_{m2} o 4,1°C dla niższego i o 3,4°C dla wyższego z badanych stężeń albuminy. Zmiany temperatury przejścia nie były skorelowane ze zmianami entalpii denaturacji, pokazanymi w tabeli 8. Próbę uzasadnienia tendencji wzrostu temperatury drugiego przejścia ze spadkiem pH oparto (MICHNIK *et al.*, 2005 a) na znanym z doniesień literaturowych zjawisku migracji kwasów tłuszczowych między molekułami albuminy przy jej ogrzewaniu (PETERS, 1985).

Tabela 8

Wyniki analizy dekonwolucyjnej dla BSA ($c_1 = 0,022$ mM, $c_2 = 0,044$ mM) uzyskane w ramach modelu niedwustanowego z dwoma przejściami (podano wartości średnie \pm błąd standardowy średniej) (MICHNIK *et al.*, 2005 a)

pH	$\Delta H_{1cal} / \text{kJ mol}^{-1}$		$\Delta H_{1cal} / \Delta H_{1vH}$		$\Delta H_{2cal} / \text{kJ mol}^{-1}$		$\Delta H_{2cal} / \Delta H_{2vH}$	
	c_1	c_2	c_1	c_2	c_1	c_2	c_1	c_2
3,5	—	323 \pm 24	—	1,5 \pm 0,2	—	181 \pm 17	—	0,5 \pm 0,1
3,8	266 \pm 10	—	1,1 \pm 0,1	—	138 \pm 2	—	0,4 \pm 0,1	—
4,0	336 \pm 54	395 \pm 38	1,6 \pm 0,3	2,0 \pm 0,2	627 \pm 40	633 \pm 69	1,8 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2
5,8	492 \pm 24	347 \pm 10	2,1 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	249 \pm 17	506 \pm 5	0,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1
7,0	332 \pm 11	348 \pm 21	1,6 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	373 \pm 11	378 \pm 43	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1

Wyniki zebrane w tabeli 8 pozwalają zauważyć, że proporcje wkładów cieplnych pochodzących od pierwszego i drugiego przejścia składowego różnią się dla różnych pH. Wyznaczone przy pH 7,0 wartości parametrów wyodrębnionych w wyniku analizy dekonwolucyjnej przejść składowych ($T_{m1} = 60,9 \pm 0,3^\circ\text{C}$, $\Delta H_{m1} = 348 \pm 21 \text{ kJ mol}^{-1}$ i $T_{m2} = 66,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$, $\Delta H_{m2} = 378 \pm 43 \text{ kJ mol}^{-1}$) są bardzo podobne do otrzymanych przez E. KANG, J. SINGH (2003): ($T_{m1} = 60,9 \pm 0,4^\circ\text{C}$, $\Delta H_{m1} = 289 \pm 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ i $T_{m2} = 66,4 \pm 1,0^\circ\text{C}$, $\Delta H_{m2} = 310 \pm 46 \text{ kJ mol}^{-1}$) przy pH 7,4. Autorka tej pracy nie doszukała się w literaturze danych umożliwiających analogiczne porównania w przypadku innych wartości pH.

Oprócz temperatur i entalpii kalorymetrycznych przejścia wyznaczono wartości entalpii van't Hoffa, ΔH_{vH} , pokazane dla różnych pH także w tabeli 8.

Stosunek entalpii kalorymetrycznej do entalpii van't Hoffa $\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}}$ dla przejścia niskotemperaturowego przyjmuje wartości większe od 1 dla każdego pH, wskazując na obecność stanów pośrednich lub więcej niż jednej podjednostki kooperatywnej podczas rozfałdowania białka. W zakresie pH od 4,0 do 7,0 wynosi on około 2, sugerując dwie strukturalne podjednostki, a poniżej wartości pH 4,0 jest bliższy wartości 1. Dla drugiego przejścia, wysokotemperaturowego, trudno zaobserwować prawidłowości w przyjmowanych wartościach stosunku $\Delta H_{\text{cal},2} / \Delta H_{\text{vH},2}$. W kwasowym środowisku (pH 3,5 oraz 3,8) wynosi on około 0,5, sugerując dimeryzację molekuł. Dla pH 4,0 wartości około 1,8 dla wyższego i 1,6 dla niższego stężenia albuminy wskazują na liczbę podjednostek bliższą 2 niż 1. W pobliżu neutralnych wartości pH bliski wartości 1 stosunek entalpii kalorymetrycznej do entalpii van't Hoffa mówi o rozfałdowaniu jednej podjednostki w przejściu dwustanowym. Proces reprezentowany przez drugi pik analizowanego przejścia endotermicznego jest zatem silnie uwarunkowany zmianami pH roztworu białka.

Zaprezentowane wcześniej wyniki sugerują istnienie trzech podjednostek ujawniających się w procesie termicznej denaturacji BSA, przy czym zmiany pH modyfikują podział cząsteczki na te podjednostki.

W przypadku roztworu BSA o wyższym stężeniu (0,044 mM) wyraźnie lepsze dopasowanie krzywych DSC uzyskano w ramach modelu niedwustanowego z trzema przejściami składowymi (I—III), co potwierdza zasugerowane przez analizę modelu z dwoma przejściami wyodrębnienie się w trakcie procesu termicznej denaturacji albuminy trzech strukturalnych podjednostek. Wyniki zaprezentowane w tabeli 9 są zgodne z wcześniejszym wnioskiem, że energetyczne

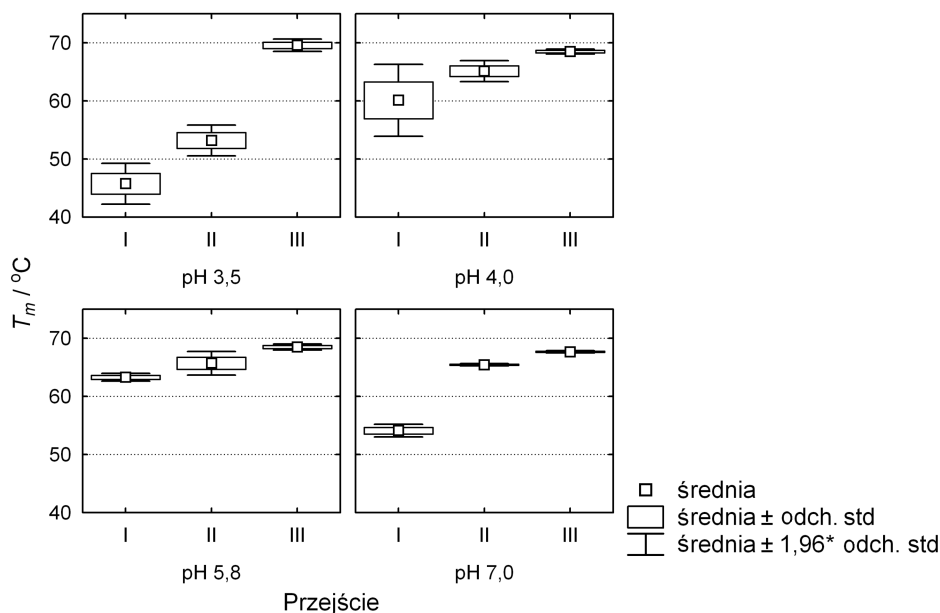
Tabela 9

Wyniki analizy dekonwolucyjnej dla BSA (stężenie 0,044 mM) uzyskane w ramach modelu niedwustanowego z trzema przejściami I—III (podano wartości średnie \pm błąd standardowy średniej) (MICHNIK *et al.*, 2005 a)

pH	Zmiana entalpii $\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$					
	ΔH_{Ical}	$\Delta H_{\text{Ical}} / \Delta H_{\text{IvH}}$	ΔH_{IIcal}	$\Delta H_{\text{IIcal}} / \Delta H_{\text{IIvH}}$	ΔH_{IIIcal}	$\Delta H_{\text{IIIcal}} / \Delta H_{\text{IIIvH}}$
3,5	46 \pm 4	0,1 \pm 0,0	289 \pm 17	1,2 \pm 0,1	184 \pm 4	0,5 \pm 0,1
4,0	255 \pm 50	1,6 \pm 0,4	515 \pm 79	1,5 \pm 0,3	251 \pm 50	0,5 \pm 0,1
5,8	402 \pm 29	2,2 \pm 0,4	406 \pm 29	1,0 \pm 0,1	213 \pm 42	0,4 \pm 0,1
7,0	146 \pm 12	0,8 \pm 0,2	603 \pm 8	2,1 \pm 0,1	117 \pm 8	0,2 \pm 0,0

wkłady poszczególnych przejść składowych zależą od pH roztworu. Warto zauważyć, że niezależnie od wartości pH zmiana entalpii odpowiadająca środkowemu (II.) przejściu jest zawsze największa. Wspólną cechą przebiegu procesu termicznej denaturacji BSA w roztworach różniących się kwasowością jest zatem to, że największy efekt cieplny towarzyszy rozfałdowaniu fragmentu makromolekuły reprezentowanemu przez środkowe przejście składowe.

Analiza rozpiętości wartości T_{mi} ($i = I, II, III$), zilustrowanych na rys. 13, pozwala wywnioskować, że w roztworze o pH 5,8 makromolekuła BSA jest najbardziej zwarta, a przy pH 3,5 jej struktura jest luźna, rozciągnięta (różnice pomiędzy T_{mI} i T_{mIII} w tych warunkach wynoszą odpowiednio 5°C i 24°C). Ob-



Rys. 13. Zależność temperatur przejścia T_{mi} ($i = I, II, III$) od pH roztworu (model niedwustanowy przy założeniu trzech przejść składowych) (opracowanie własne)

raz ten jest zgodny z propozycjami struktur konformacyjnych izomerów N, F i E albuminy (CARSON, 1987 — ich ilustracja graficzna zamieszczona została np. w pracy: D.C. CARTER, J.X. HO, 1994 jako Fig. 12). Wartości T_{mI} i T_{mII} są wyraźnie niższe dla albuminy w roztworze najbardziej kwaśnym z badanych, natomiast dla wartości T_{mIII} ujawnia się słaba tendencja malejąca ze wzrostem pH, ale różnice między wartościami T_{mIII} przy różnych pH okazały się nieistotne statystycznie.

Wyznaczone dla poszczególnych przejść składowych stosunki $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ (tabela 9) dostarczyły informacji na temat różnic w przebiegu rozfałdowania cząsteczki BSA w roztworach o pH 7,0 i 5,8. Przy pH 7,0 dla pierwszego przejścia (I) przebiegającego w zakresie najniższych temperatur stosunek ten był bliższy 1, dla drugiego (II) wynosił około 2, a dla trzeciego (III), około 0,2. Przy pH 5,8 wartości $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ dla dwóch pierwszych przejść kształtowały się odwrotnie, a dla trzeciego było to 0,4. Wyniki te sugerują, że przy pH 7,0 przejścia I i II z temperaturami: $T_{mI} \approx 54^\circ\text{C}$ i $T_{mII} \approx 65,5^\circ\text{C}$ reprezentują rozfałdowanie kolejno jednej, a następnie dwóch domen BSA. W przypadku pH

5,8 przejścia w temperaturach $T_{ml} \approx 63^\circ\text{C}$ i $T_{mII} \approx 66^\circ\text{C}$ są związane z rozfałdowaniem odpowiednio: dwóch, a następnie jednej domeny BSA. Zakładając, że makromolekuła BSA dzieli się na podobne dwa fragmenty przy obydwu wartościach pH: mniejszy — zawierający jedną z domen i większy — zawierający dwie domeny, rozfałdowanie następowałoby od C- lub N-końca, zależnie od pH. Taki wniosek jest w zgodzie z obserwacjami dotyczącymi procesu rozfałdowania odtłuszczonej formy albuminy wołowej w podobnych warunkach pH. C. GIANCOLA *et al.* (1997) stwierdzili, że w roztworze o pH 7 N-końcowy fragment (domena I) rozfałdowuje się najpierw, czyli w zakresie niższych temperatur, a następnie wspólnie rozfałdowują się domeny II i III. Autorka tej pracy wykazała (MICHNIK, 2003), że w roztworze wodnym o pH 5,8 większy C-końcowy fragment BSAf, zawierający domenę III oraz większą część domeny II, rozfałdowuje się jako pierwszy, tzn. w zakresie niższych temperatur. Przedstawione tu wyniki badań wyjaśniają zatem wspomnianą w rozdziale 9.4 pozorną sprzeczność między sugerowanymi przebiegami termicznego rozfałdowania albuminy (GIANCOLA *et al.*, 1997; MICHNIK, 2003).

Parametry trzeciego przejścia składowego, w tym także stosunek entalpii kalorymetrycznej do entalpii van't Hoffa, były bardzo podobne w zakresie pH od 4,0 do 7,0. Prawdopodobne jest, że przejście to reprezentuje frakcję molekuł stabilizowanych dodatkowo kwasami tłuszczowymi migrującymi podczas ogrzewania roztworu albuminy (PETERS, 1985). Mniejsza od 1 wartość $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ (0,2—0,5) wskazuje na agregację białka.

Podsumowując wyniki badań wpływu pH na przebieg termicznej denaturacji albuminy wołowej zawierającej naturalnie obecne w niej kwasy tłuszczowe (MICHNIK *et al.*, 2005 a), można stwierdzić, że zaobserwowane zmiany w profilach DSC albuminy powodowane zmianą pH roztworu, związane są w dużym stopniu z przekształcaniem się poszczególnych izomerycznych form albuminy. Należy też zauważyć, że kształt krzywej DSC odzwierciedla stan strukturalny makromolekuły i zmienia się ze zmianą siły stabilizujących go oddziaływań. Różne czynniki mogą jednak wywoływać podobne efekty. Zmiana pH w kierunku powodującym rozluźnienie struktury białka, a w następstwie jego rozfałdowanie z mniejszym nakładem energii cieplnej, może być równoważna w sensie efektu widocznego na krzywej DSC zmianom czasowym zachodzącym w roztworze białka. Śledząc takie zmiany w roztworach wodnych BSA (MICHNIK *et al.*, 2004), zaobserwowano, że pojedynczy pik dla świeżego roztworu BSA w określonych warunkach środowiskowych i pomiarowych przekształca się z czasem w pik z ramieniem, szerokie przejście bimodalne, a następnie w „szczytkowy”, mały pojedynczy pik reprezentujący prawdopodobnie rozfałdowanie molekuły albuminy, której struktura uległa rozluźnieniu, a nawet zniszczeniu w czasie przechowywania i tylko niewielki efekt cieplny wiąże się z jej termiczną denaturacją. Podobny przebieg zmian zarejestrowano przy obniżaniu pH poniżej wartości 4. Przekształcanie się formy N w F, a następnie

w E przy wzrastającej kwasowości związane jest z częściowym otwarciem makromolekuły. Przejście N—F prowadzi także do dużych zmian w hydratacji. Zaobserwowano, że zmiany zachodzące ze zmniejszaniem się pH w roztworze o niższym z badanych stężeniu albuminy wyprzedzały zmiany zachodzące w roztworze o wyższym stężeniu. Wyraźnie różny obraz termicznego rozfałdowania albuminy uzyskano dla obydwu stężeń przy pH 3,5. W tym stosunkowo kwaśnym środowisku, w roztworze o niższym stężeniu, rozfałdowaniu makromolekuły BSA towarzyszy 4-krotnie mniejszy efekt cieplny niż w roztworze o dwukrotnie wyższym stężeniu białka.

Warto podkreślić wynikające z przedstawionych tu badań i doniesień literaturowych różnice pomiędzy albuminą odtłuszczoną i nieodtłuszczoną. Badając wpływ pH na termiczne rozfałdowanie albuminy odtłuszczonej, przy pH < 3,5, M. YAMASAKI *et al.* (1990) nie obserwował już żadnego przejścia, podczas gdy dla podobnego stężenia albuminy nieodtłuszczonej w badaniach A. MICHNIK *et al.* (2005 a), niewielkie przejście stałe było obserwowane. Mała entalpia termicznej denaturacji obserwowana w tych warunkach świadczy o łatwym, przebiegającym z niewielkim efektem cieplnym, zniszczeniu struktury białka.

6.2. Proces termicznej denaturacji HSA i HSAf w roztworach wodnych etanolu

6.2.1. Białka w roztworach wodno-alkoholowych

Alkohole zmieniają natywną strukturę białka, w dużych stężeniach powodując jego nieodwracalną denaturację. Już badania prowadzone przez W.W. Lepeschkina w pierwszej połowie XX wieku (1923 rok) wskazały na podobieństwo pomiędzy cieplną i powodowaną przez etanol denaturacją białek. F.A. JOHNSON, D.H. CAMPBELL (1946) zaobserwowali, że alkohol przyspiesza proces termicznej denaturacji białka oraz oszacowali, że w temperaturze 65°C około 1,5 razy więcej cząsteczek etanolu łączy się z cząsteczkami globulin surowicy ludzkiej, które uległy denaturacji, niż z natywnymi. Choć tematyka oddziaływania alkoholi z białkami jest stale aktualna w pracach naukowych, mechanizm działania alkoholi na biomolekuły pozostaje niejasny i jest nadal problemem żywo dyskutowanym (KLEMM, 1998; HIROTA-NAKAOKA, GOTO, 1999; DWYER, BRADLEY, 2000; DESPHANDE *et al.*, 2005; BANERJE, KISHORE, 2005).

Oddziaływania alkohol—białko są ważne nie tylko w kontekście lepszego zrozumienia procesu fałdowania białek, wyjaśnienia natury sił stabilizujących

ich natywną konformację, lecz mają także pewne znaczenie praktyczne związane z poznaniem wpływu alkoholu na procesy biologiczne, szczególnie te, w których białka odgrywają istotną rolę (LAKSHMAN *et al.*, 1999; MOLINA-PEREZ *et al.*, 2000). Mieszanki wodno-alkoholowe są przedmiotem częstych badań ze względu na specyficzny wpływ, jaki wywiera dodatek alkoholu na właściwości i strukturę wody (D'ANGELO *et al.*, 1994; TANIEWSKA-OSIŃSKA, PIEKARSKI, 1994, 1984; PIEKARSKI, TKACZYK, 1995; ONORI, SANTUCCI, 1996; TAKAMUKU *et al.*, 2005). Oddziaływania molekularne w roztworach mogą być z powodzeniem badane m.in. z zastosowaniem metod kalorymetrycznych (PIEKARSKI, 2004).

Cząsteczka alkoholu zawiera grupę wodorotlenową, wbudowanie się jej zatem do przestrzennej sieci wiązań wodorowych jest prawdopodobnie łatwe i wpływ alkoholu na wodę zależy głównie od wielkości i kształtu węglowodorowego łańcucha alkoholu. Łańcuchy alkoholowe zmieniają strukturę wody. Najczęściej wpływ alkoholi na budowę wody rozpatruje się jako klatratopodobną, hydrofobową hydratację. Występowanie tego zjawiska powoduje utrudnioną w porównaniu ze środowiskiem czystej wody solwatację jonów, a to wiąże się ze zwiększeniem endotermicznych lub zmniejszeniem egzotermicznych efektów rozpuszczania.

Alkohole prawdopodobnie nie tworzą silnych kompleksów z białkami. Jednakże są doniesienia literaturowe świadczące o istnieniu słabych kompleksów, powstających na zasadzie oddziaływań hydrofobowych pomiędzy łańcuchami alifatycznymi alkoholi i resztami aminokwasowymi łańcuchów bocznych białka, wspomaganymi wiązaniami wodorowymi (LUBAS *et al.*, 1979), a także o bezpośrednim wiązaniu alkoholu do różnych białek w specyficzny sposób (AVDULOV *et al.*, 1996; BRILL *et al.*, 1976; KRUSE *et al.*, 2003; MUHOBERAC *et al.*, 1988). Aktualnie panuje przekonanie, że alkohole są głównie donorami wiązania wodorowego, a ich wiązanie do łańcucha polipeptydowego jest stabilizowane oddziaływaniami hydrofobowymi. Miejsca wiążące dla cząsteczek alkoholi są często ulokowane w pobliżu *N*-końca, zawierają segment typu „zakręt” lub „pętla”, które sąsiadują z α -helisą (DwyER, BRADLEY, 2000).

Inna koncepcja zakłada pośredni efekt działania alkoholu, polegający na zmianach właściwości rozpuszczalnika. Skutki wywoływane przez alkohol w roztworach białek przypisywane są strukturalnej reorganizacji wody w obecności alkoholu i specyficznym właściwościom mieszaniny woda — alkohol (występującym w zakresie składu, w którym dominuje woda). Za taką hipotezą przemawia zauważona korelacja między wpływem alkoholu na konformacyjne i dynamiczne właściwości biomolekuł i zmianami we właściwościach rozpuszczalnika wodno-alkoholowego (CALANDRINI *et al.*, 2000, 2001).

Denaturujący efekt alkoholi jest w dużym stopniu spowodowany zmniejszeniem średniej wartości stałej dielektrycznej mieszaniny wodno-alkoholowych (DUFOR *et al.*, 1993; UVERSKY *et al.*, 1997; ZAVODNIK *et al.*, 1997). W rozpusz-

czalnikach o niższej polarności oddziaływania hydrofobowe, stabilizujące natywną strukturę, są osłabiane. Nie tylko destabilizacja trzeciorzędowej, lecz także zmiany w drugorzędowej strukturze białka pod wpływem alkoholu zostały potwierdzone doświadczalnie (CHEN *et al.*, 1999; HAMADA *et al.*, 1995; HERSKOVITS *et al.*, 1970; HIROTA-NAKAOKA, GOTO, 1999; LIN *et al.*, 1999, 2004 a, b; SHIRAKI *et al.*, 1995; SUNDD *et al.*, 2000).

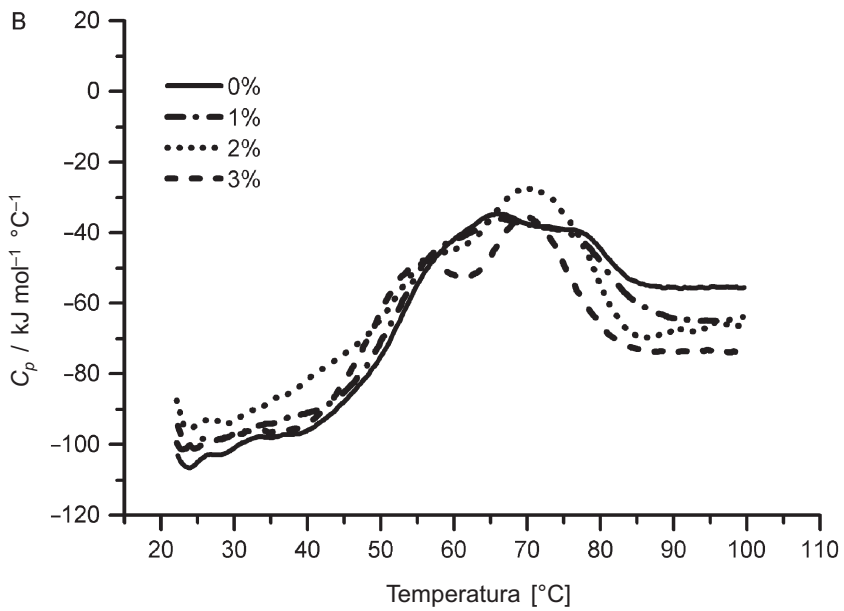
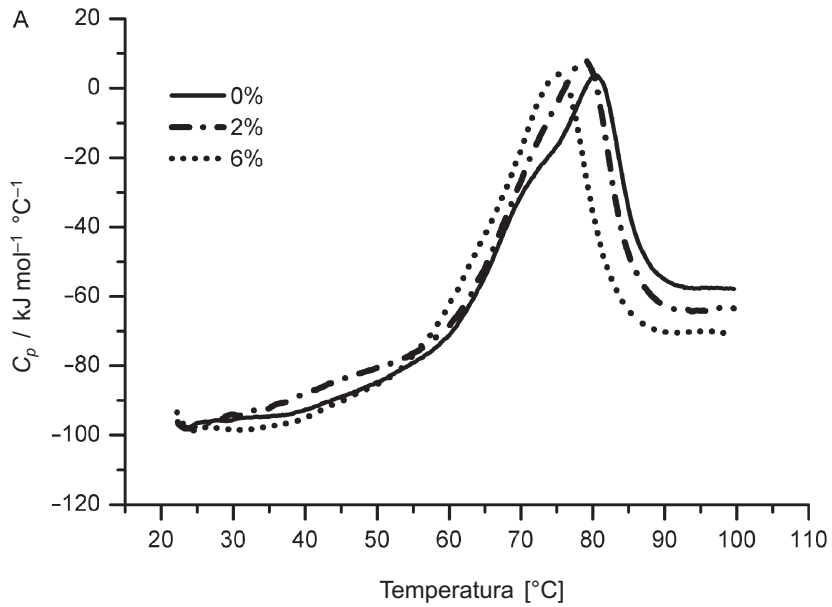
Wypierając niektóre leki z ich miejsc wiążących w białkach, alkohol może zmieniać farmakokinetykę. Dowiedziono, że etanol wpływa na wiązanie warfaryny (leku o działaniu antykoagulacyjnym) do ludzkiej albuminy (HA *et al.*, 2000).

6.2.2. Proces termicznej denaturacji HSA i HSAf w obecności etanolu

Modyfikacje struktur białkowych w roztworach wodno-alkoholowych w stosunku do ich form natywnych w roztworach wodnych znajdują odzwierciedlenie w zmianach przebiegu termicznej denaturacji białka. Specyfikę tego zjawiska zbadano, stosując technikę różnicowej kalorymetrii skaningowej do poznania przemian termicznych surowiczej albuminy ludzkiej w roztworach wodnych w obecności etanolu (MICHNIK *et al.*, 2006, 2007 a, b). Ze względu na sugestie, że miejsca wiążące dla etanolu mają charakter hydrofobowy i mogą nimi być te same, do których w albuminie wiążą się kwasy tłuszczowe (AVDULOV *et al.*, 1996), w pracach A. MICHNIK *et al.* skupiono uwagę na porównaniu oddziaływań etanolu z albuminą pozbawioną kwasów tłuszczowych oraz z tą, do której przyłączone są kwasy tłuszczowe.

Biorąc pod uwagę fizjologię człowieka, najbardziej interesującym zakresem stężeń alkoholu byłby taki, który odpowiada możliwym stężeniom alkoholu we krwi po spożyciu alkoholu, tzn. od 0,1% v/v do 0,5% v/v. Farmakologiczne efekty alkoholu są widoczne w zakresie stężeń 0,02—0,9% v/v (5—150 mM). Jednakże tak małe stężenie etanolu nie powoduje dostrzegalnej zmiany w kształcie i parametrach obserwowanego na krzywej DSC przejścia albuminy. Przy stężeniu etanolu rzędu dziesiątych części M i stężeniu białka kilkadziesiąt μM (odpowiednim w pomiarach mikrokalorymetrycznych) wartość stosunku molowego etanolu do białka jest znacznie większa od tej, jaka może odpowiadać prawdopodobnym stężeniom we krwi.

Porównując profile DSC termicznej denaturacji HSA i HSAf, zilustrowane na rys. 14 A i B, łatwo zauważyć, że wpływ etanolu na dwa badane rodzaje albuminy objawia się inaczej. Najwyraźniejszym efektem powodowanym przez etanol odnośnie do albuminy nieodtłuszczonej jest obniżenie jej temperatury przejścia (T_m), natomiast w stosunku do albuminy odtłuszczonej ujawnienie



Rys. 14. Krzywe DSC nieodtłuszczonej (A) oraz odtłuszczonej (B) albuminy surowicy ludzkiej w obecności wskazanych stężeń etanolu (% v/v); stężenie albuminy 0,0225 mM, szybkość skanowania 1°C min^{-1} (MICHNIK, 2007 b)

jego bimodalnego charakteru. Ze wzrostem stężenia etanolu obserwuje się wyostrzenie się piku w przypadku HSA (z wyjątkiem najwyższego z badanych stężeń — 20% v/v), a poszerzenie z jednoczesnym wyodrębnieniem dwóch maksimumów lokalnych nadmiarowej pojemności cieplnej w przypadku HSAf. Wspólnym dla obydwu albumin efektem dodania etanolu do ich wodnych roztworów jest zredukowanie wartości ΔC_p denaturacji. Podobny efekt, zaobserwowany przy rozfałdowaniu ubikwityny w obecności metanolu, gdzie ΔC_p spadało do wartości bliskiej zeru w 30% (v/v) metanolu, przedyskutowany został w pracy D.N. WOOLFSON *et al.* (1993).

Przyczyna zmniejszenia szerokości połówkowej przejścia HSA w obecności etanolu nie jest jasna. Próba wytłumaczenia efektu może być wzrost kooperatywności przejścia uwarunkowany powstaniem bardziej zwartej struktury białka, np. na skutek relacjonowanej przez autorów niektórych prac stabilizacji i wzrostu jego struktury α -helikalnej w roztworach alkoholu (HIROTA-NAKAOKA, GOTO 1999; HAMADA *et al.*, 1995; SHIRAKI *et al.*, 1995; SUNDD *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2004). Przy dużym, 20% v/v stężeniu etanolu wyostrzenie piku zanika, przejście rozpoczyna się w niższej temperaturze i rozciąga się w szerszym zakresie temperatur, co świadczy o destabilizującym wpływie alkoholu na strukturę białka (MICHNIK, DRZAZGA, 2007 b).

Efekt wzrostu szerokości połówkowej piku, obserwowany dla albuminy odtłuszczonej w obecności etanolu, przypisać można głównie pojawiającej się bimodalności przejścia. Maksimum pierwszego ze składowych przejść („I” — realizowanego w zakresie niższych temperatur) przesuwają się w kierunku niższych temperatur ze wzrostem stężenia etanolu, natomiast drugiego („II” — realizowanego w zakresie wyższych temperatur) przesuwają się nieznacznie w kierunku temperatur wyższych przy wzroście stężenia etanolu do około 3% v/v, a następnie pozostaje praktycznie niezmiennie do około 10% v/v. Opisane spostrzeżenia wyjaśniono wiązaniem molekuł etanolu do albuminy (MICHNIK, 2007 a).

6.2.3. Wiązanie etanolu do albuminy

Przyczyną zmiany temperatury T_m rozfałdowania albuminy w roztworach woda—etanol może być wiązanie molekuł etanolu do makromolekuły białka. Wiązanie ligandów do formy natywnej białka powoduje wzrost, a wiązanie do formy zdenaturowanej obniżenie wartości T_m (COOPER, 1993, 2000). Systematyczne obniżanie się temperatury przejścia HSA ze wzrostem stężenia etanolu świadczy o wiązaniu etanolu do zdenaturowanej formy albuminy nieodtłuszczonej. Wyniki DSC dla albuminy odtłuszczonej sugerują, że w roztworach o niskich stężeniach etanolu możliwe jest jego wiązanie zarówno do natywnych, jak

i zdenaturowanych form makromolekuły, natomiast przy dużych stężeniach — tylko do formy zdenaturowanej (MICHNIK, 2007 a, b).

W układach białko — ligand występowanie dwóch składowych przejścia przypisuje się najczęściej oddzielnemu rozfałdowaniu dwóch frakcji białka: „bogatej” i „ubogiej” pod względem przyłączonego liganda (SHRAKE, ROSS, 1988, 1990). Bimodalność przejścia opisującego termiczną denaturację albuminy odtłuszczonej w obecności etanolu nie musi jednak wynikać z obecności różnych frakcji molekuł białka. Można ją także wytłumaczyć oddzielnym rozfałdowaniem fragmentów makromolekuły albuminy, charakteryzujących się różną trwałością termiczną. W podobny sposób w rozdziale 6 uzasadniono bimodalny charakter termicznego rozfałdowania pozbawionej kwasów tłuszczowych albuminy surowicy wołowej w roztworach wodnych (MICHNIK, 2003). Zgodnie z taką hipotezą w procesie denaturacji można wyodrębnić co najmniej dwa etapy. W pierwszym następuje rozfałdowanie fragmentu makromolekuły o niższej termostabilności. Na skutek przyłączenia do niego molekuł etanolu jest on dodatkowo destabilizowany, co prowadzi do obniżenia jego temperatury przejścia. Drugie przejście składowe odpowiada fragmentowi rozfałdowującemu się w zakresie wyższych temperatur. Ewentualne wiązanie molekuł etanolu do tej części albuminy wywiera przy niskim stężeniu alkoholu nieznaczny efekt stabilizujący. Wskazuje to na wiązanie etanolu do niezmienionej makromolekuły, jeszcze przed rozpoczęciem procesu jej rozfałdowania pod wpływem wzrostu temperatury.

Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe o zajmowaniu przez etanol miejsc wiążących kwasy tłuszczowe (AVDULOV *et al.*, 1996) oraz fakt, że w zakresie badanych stężeń nie zaobserwowano podobnego efektu stabilizującego w przypadku albuminy nieodtłuszczonej, prawdopodobne wydaje się bezpośrednio, specyficzne wiązanie etanolu do „pustych” po kwasach tłuszczowych miejsc wiążących znajdujących się w bardziej trwałym termicznie fragmencie makromolekuły. Stabilizujące działanie małych stężeń etanolu zaobserwowano także dla innych białek. Wartość T_m receptorowego białka Interleukin-1 wzrasta od 48,1°C do 48,6°C w obecności 5,1 mg/ml etanolu, ale maleje do 43,8°C przy 50 mg/ml (REMMELE *et al.*, 1998).

Na podstawie wyników badań odwracalności procesu termicznej denaturacji albuminy w roztworach woda — etanol oraz ich zależności od szybkości skanowania, uznano, że — podobnie jak w roztworach wodnych — możliwa jest analiza w ramach termodynamiki równowagowej (MICHNIK, 2007 b). Przyjmując model równowagowy rozfałdowania białka z jednoczesnym wiązaniem ligandów, zmianę T_m ze wzrostem stężenia liganda można powiązać z dodatkową energią Gibbsa stabilizacji ($\Delta\Delta G$), gdy ligand wiąże się do natywnego białka lub destabilizacji ($-\Delta\Delta G$), gdy ligand wiąże się do formy rozfałdowanej (COOPER, 2000). Zakładając, że makromolekuła albuminy ma n identycznych, niezależnych miejsc wiążących dla etanolu, z takimi samymi stałymi asocjacji

K_b , energia swobodna Gibbsa rozfałdowania białka w danej temperaturze (T) jest dana przez:

$$\Delta G = \Delta G^0 - nRT \ln(1 + K_b[et]), \quad (7.1)$$

gdzie: R jest stałą gazową, $[et]$ — stężeniem swobodnego etanolu (w przeprowadzonym eksperymencie za $[et]$ przyjęto stężenie całkowite etanolu ze względu na jego nadmiar w stosunku do białka), ΔG^0 — energią swobodną Gibbsa rozfałdowania białka w nieobecności liganda.

Rozważając wiązanie etanolu do rozfałdowanej formy albuminy oraz przyjmując $T_{1/2[et]}$ jako temperaturę, w której ΔG rozfałdowania białka w roztworze o określonym stężeniu etanolu $[et]$ równa się zero (w tej temperaturze proces rozfałdowania zrealizowany jest w 50%), $\Delta\Delta G$ można wyrazić dwójako:

$$\Delta\Delta G = nRT_{1/2[et]} \ln(1 + K_b[et]), \quad (7.2)$$

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G = \Delta G^0(T_{1/2[et]}) = \Delta H(T_{1/2[et]}) \frac{T_{1/2[et]} - T_{1/2}^0}{T_{1/2[et]}} - \\ - \Delta C_p^0 \left(T_{1/2[et]} - T_{1/2}^0 + T_{1/2}^0 \ln \left(\frac{T_{1/2}^0}{T_{1/2[et]}} \right) \right). \end{aligned} \quad (7.3)$$

gdzie: $T_{1/2}^0$ jest temperaturą $T_{1/2[et]}$ przy zerowym stężeniu etanolu. Wartość ΔC_p^0 wyznaczono z zależności $\Delta H(T_{1/2[et]})$ względem $T_{1/2[et]}$. Trzeba zdawać sobie sprawę, że przy tego typu oszacowaniu ΔC_p^0 możliwe jest popełnienie dużego błędu, nawet do 50% (RÖSGEN, HINZ, 2001).

Dzięki zależnościom:

$$\frac{\partial(\Delta\Delta G)}{\partial \ln[et]} = nRT_{1/2[et]} \frac{K_b[et]}{1 + K_b[et]} < nRT_{1/2[et]} \quad (7.4)$$

oraz

$$\frac{\partial(\Delta\Delta G)}{\partial [et]} = nRT_{1/2[et]} \frac{K_b}{1 + K_b[et]} < nRT_{1/2[et]} K_b \quad (7.5)$$

oszacowano z nachyleń liniowych wykresów $\Delta\Delta G$ względem $\ln[et]$ oraz względem $[et]$ dolne granice wartości n i nK_b (MICHNIK, 2007 a). Podobną metodę zastosowano do wyznaczenia parametrów wiązania anestetyku halotan do natywnej formy BSA (TANNER *et al.*, 1999).

Oszacowania minimalnych wartości parametrów n i K_b przeprowadzono dla dwóch stężeń albumin ludzkich: odtłuszczonej i nieodtłuszczonej, w kilku zakresach stężenia etanolu (MICHNIK, 2007 a). Ze względu na μM stężenie białka warunki te odpowiadały nadmiarowi etanolu w stosunku do albuminy (nawet przy najniższym badanym stężeniu etanolu, 1% v/v, tysiące molekuł etanolu przypadają na jedną makromolekułę albuminy). W zakresie stężeń etanolu do 3% v/v uzyskano minimalną wartość n mniejszą od 1, a K_b powyżej $1,2 \text{ M}^{-1}$ dla HSA i $4,4 \text{ M}^{-1}$ dla HSAf. Te, wprawdzie minimalne, oszacowane wartości K_b są znacznie mniejsze od wartości $19,3 \text{ M}^{-1}$ otrzymanej przez N.A. AVDULOVA *et al.* (1996) dla wiązania etanolu do BSA. Należy jednak zwrócić uwagę, że eksperyment N.A. Avdulova dotyczył wiązania w temperaturze $36,5^\circ\text{C}$ i przeprowadzony był dla jeszcze niższych stężeń etanolu (0,025—0,2 M). Wartości K_b oszacowane przez A. Michnik odnoszą się do temperatury przejścia białka ze stanu natywnego w rozfałdowany i do stężeń etanolu powyżej 0,2 M. W zakresie stężeń etanolu od 0,5 M do 3,4 M uzyskano większe wartości n (od 1 do 3) i jeszcze mniejsze wartości K_b . Wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosku o istnieniu miejsc wiążących o różnym powinowactwie do alkoholu.

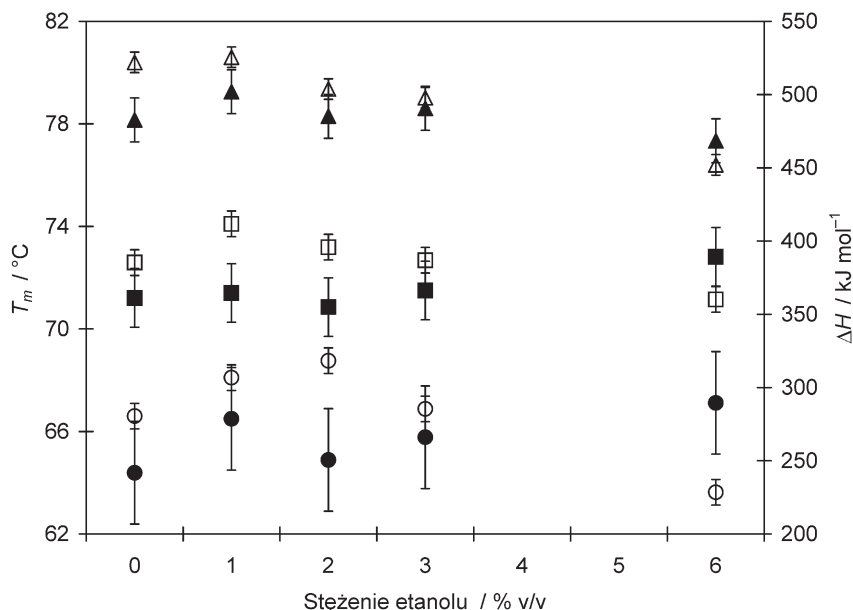
Podsumowując wyniki prac A. MICHNIK (2007 a, b), można stwierdzić, że etanol silniej wiąże się do albuminy odtłuszczonej niż do nieodtłuszczonej, co potwierdza sugestie o zajmowaniu miejsc wiążących kwasy tłuszczowe. Przy niskich stężeniach alkoholu (poniżej 0,5 M) przynajmniej co druga cząsteczka albuminy tworzy kompleks z cząsteczką etanolu. Przy wyższych stężeniach etanolu (powyżej 0,5 M) więcej niż trzy cząsteczki etanolu mogą się wiązać do rozfałdowanej cząsteczki albuminy, ale słabiej niż w zakresie niższych stężeń denaturanta.

Stabilizujące strukturę albuminy działanie małych stężeń etanolu, a destabilizujące dużych, oraz odmienny charakter kompleksów albuminy z molekułami etanolu przy jego niskim i wysokim stężeniu sugerują zależność tych efektów od właściwości mieszanin wodno-alkoholowych. Stwierdzono, że alkohol wywołuje przeciwne skutki przy niskim i wysokim stężeniu także w innych procesach. Zaobserwowano, że dodanie małych ilości alkoholu redukuje, a dużych podwyższa krytyczne stężenie micelizacji (CMC). Wykazano, że mieszaniny wodno-alkoholowe charakteryzują się odmiennymi właściwościami w różnych zakresach składu (TANIEWSKA-OSIŃSKA, PIEKARSKI, 1994, 1984; D'ANGELO *et al.*, 1994; ONORI, SANTUCCI, 1996). Ważny parametr termodynamiczny, cząstkowa molowa objętość mieszaniny etanol — woda, wykazuje minimum w zakresie niskich zawartości etanolu, korelujące z minimum promienia hydrodynamicznego lizozymu w takich roztworach (występuje ono przy frakcji molowej etanolu około 0,02) (CALANDRINI *et al.*, 2000, 2001). W roztworach o bardzo małym stężeniu alkoholu jego molekuły są monomolekularnie rozproszone i otoczone przez molekuły wody. W ograniczonym zakresie stężeń alkoholu w wodzie tworzone są struktury klatratopodobne. Powyżej pewnego stężenia alkoholu wystę-

puje agregacja cząsteczek alkoholu. Powoduje ona silne modyfikacje solwatacji grup hydrofobowych. Przy dużej zawartości alkoholu w mieszaninie efekty te zanikają, dominują natomiast oddziaływania wody z polarnymi grupami hydroksylowymi i asocjacje cząsteczek alkoholi (D'ANGELO *et al.*, 1994). Skutki wywołane przez alkohol w roztworach białek mogą być zatem w dużej mierze związane z efektami występującymi w rozpuszczalniku woda — etanol.

6.2.4. Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC albuminy w roztworach etanol – woda

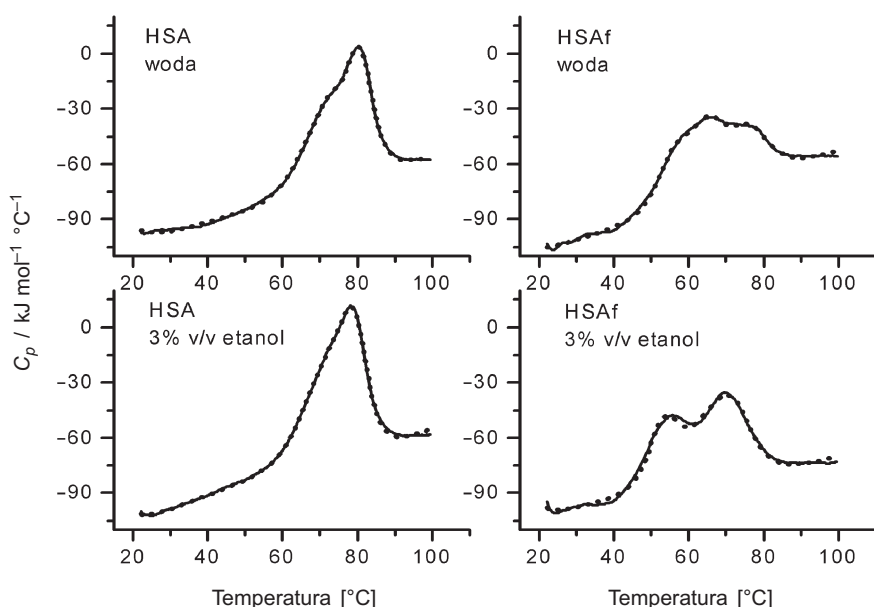
Ze względu na stwierdzoną mniejszą procentową odwracalność procesu termicznego rozfałdowania w roztworach alkoholu niż w czystej wodzie (MICHNIK, DRZAZGA, 2007 b) rozważania z zastosowaniem modeli równowagowych ograniczono do maksymalnego stężenia etanolu 6% v/v (1 M). W roztworach etanolu stosunek entalpii kalorymetrycznej do entalpii van't Hoffa okazał się dla HSA bliski wartości 3, co zasugerowało wybór modelu dwustanowego z trzema niezależnymi przejściami składowymi. Zastosowano dwie wersje tego modelu: z $\Delta C_p = 0$ oraz z $\Delta C_p \neq 0$. Na rys. 15 zilustrowano zależność wyznaczonych



Rys. 15. Parametry termodynamiczne (średnia \pm błąd standardowy średniej) trójskładnikowego przejścia dla HSA uzyskane w modelu dwustanowym z $\Delta C_p = 0$ (kółka, kwadraty i trójkąty odpowiadają kolejnym przejściom: I, II, III, symbole puste odpowiadają temperaturom przejścia, a pełne — zmianom entalpii) (MICHNIK, DRZAZGA, 2007)

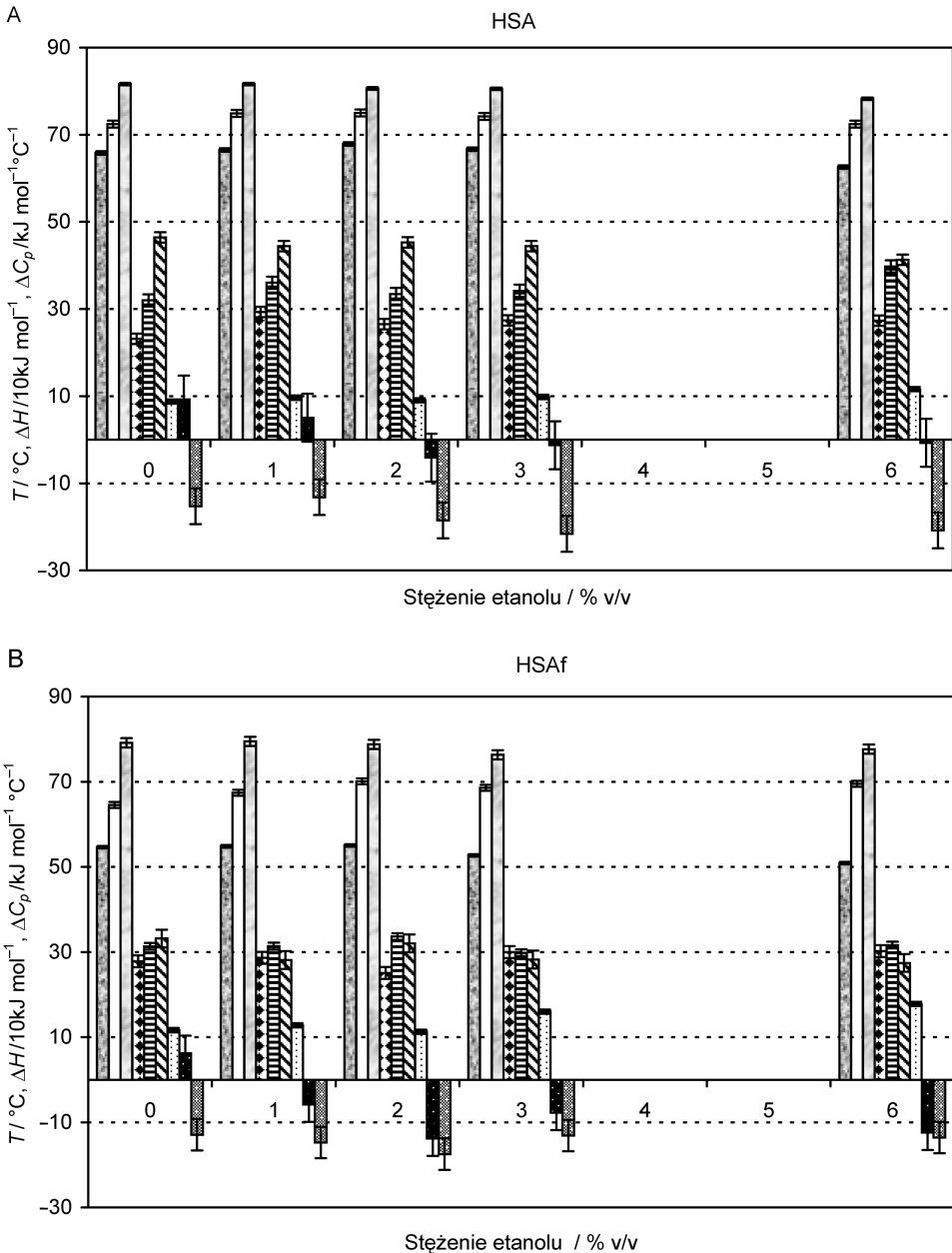
w ramach modelu z $\Delta C_p = 0$ parametrów dopasowania od stężenia etanolu, a na rys. 16 przykładowe dopasowanie krzywej w modelu z $\Delta C_p \neq 0$.

Ujawniający się w obecności etanolu bimodalny charakter krzywej DSC albuminy odtłuszczonej sugeruje dwa przejścia składowe. Należy jednak zwrócić uwagę, że bimodalność przejścia nie upoważnia do stwierdzenia obecności dokładnie dwóch podjednostek strukturalnych w procesie termicznej denaturacji białka. Wyodrębnienia takich podjednostek można dokonać dopiero na podstawie analizy dekonwolucyjnej krzywych DSC. Rzeczywiście, próba dopasowania termicznych profili albuminy HSAf z założeniem dwóch przejść składowych nie dała dobrych rezultatów w żadnym z zastosowanych modeli. Także model dwustanowy z trzema niezależnymi przejściami składowymi i $\Delta C_p = 0$ nie pozwolił uzyskać satysfakcjonujących wyników dla HSAf w roztworach etanolu. Dobre dopasowanie krzywych DSC albuminy otrzymano dopiero, gdy założono trzy przejścia składowe i zastosowano model z $\Delta C_p \neq 0$.



Rys. 16. Dopasowanie krzywych DSC albumin HSA i HSAf w roztworach wodnych oraz 3% v/v etanolu w ramach modelu dwustanowego z trzema przejściami składowymi, $\Delta C_p \neq 0$; (—) — krzywa doświadczalna, (.....) — krzywa teoretyczna (MICHNIK, DRZAZGA, 2007)

Biorąc pod uwagę temperatury i entalpie przejścia, modele z $\Delta C_p = 0$ i z $\Delta C_p \neq 0$ dały podobne wartości parametrów dla HSA. Stwierdzono wzrost temperatur przejść składowych, szczególnie dwóch pierwszych (licząc w kierunku rosnącej temperatury przejścia) w roztworach 1% i 2% v/v etanolu w porównaniu z roztworem wodnym (rys. 15 i 17). Z dalszym wzrostem stężenia etanolu, do 6% v/v, wszystkie trzy temperatury przejścia wykazywały tendencję



Rys. 17. Parametry termodynamiczne (średnia \pm błąd standardowy średniej) trójskładnikowego przejścia dla HSA (A) i HSAf (B), uzyskane w modelu dwustanowym z $\Delta C_p \neq 0$ (zestaw słupków od lewej do prawej dla każdego stężenia etanolu odpowiada kolejno parametrom: T_1 , T_2 , T_3 (w $^\circ\text{C}$), ΔH_1 , ΔH_2 , ΔH_3 (w 10 kJ mol^{-1}), ΔC_{p1} , ΔC_{p2} , ΔC_{p3} (w $\text{kJ mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$) (MICHNIK, DRZAŻGA, 2007)

spadkową, wskazującą na wiązanie się etanolu do rozfałdowanej makromolekuły albuminy i jej destabilizację. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy zmianami entalpii, towarzyszącymi przejściom przy różnych stężeniach etanolu, poza wartością ΔH_3 , która była wyraźnie mniejsza w warunkach najwyższego stężenia alkoholu.

Model z $\Delta C_p \neq 0$ dostarczył dodatkowych informacji w postaci wartości zmian pojemności cieplnej ΔC_{pi} ($i = 1, 2, 3$) w poszczególnych przejściach składowych oraz umożliwił porównanie parametrów dla albuminy odtłuszczonej i nieodtłuszczonej. Na rys. 17 przedstawiono średnie wartości tych parametrów dla obydwu albumin w funkcji stężenia etanolu.

W przypadku HSAf stwierdzono wyraźny wzrost (aż o $5,6^\circ\text{C}$) temperatury środkowego pod względem obejmowanego zakresu temperatur przejścia, przy wzroście stężenia etanolu z 0% v/v do 2% v/v (0,3 M). Sugeruje to wiązanie etanolu do natywnej domeny (lub części) albuminy, tej, która ze wzrostem temperatury rozfałdowuje się jako druga spośród wyodrębnionych trzech podjednostek. Maksymalny wzrost analogicznych temperatur przejścia T_1 i T_2 dla podjednostek HSA to odpowiednio $2,1^\circ\text{C}$ i $2,6^\circ\text{C}$, co wskazuje na słabsze wiązanie etanolu do albuminy nieodtłuszczonej niż do pozbawionej kwasów tłuszczowych. Przemawia to za słuszością sugestii N.A. AVDULOV *et al.* (1996) o oddziaływaniu etanolu z miejscami wiążącymi albuminy zajmowanymi przez kwasy tłuszczowe. Ponieważ pierwszorzędowe miejsce wiążące dla krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych znajduje się w subdomenie IIA, prawdopodobne jest, że etanol oddziałuje preferencyjnie właśnie z tym miejscem. W roztworach o stężeniu etanolu powyżej 0,5 M działa on jako denaturant i wiążąc się do albuminy w stanie rozfałdowanym destabilizuje jej strukturę.

Uzyskane w ramach modelu z $\Delta C_p \neq 0$ wartości zmian pojemności cieplnej, towarzyszące rozfałdowaniu trzech podjednostek albuminy, informują o zróżnicowanym charakterze procesu, biorąc pod uwagę odsłanianie grup polarnych i niepolarnych na działanie rozpuszczalnika. Dodatkowo zmiany pojemności cieplnej przypisuje się grupom hydrofobowym białka, schowanym w jego wnętrzu w stanie natywnym, a eksponowanym na działanie rozpuszczalnika podczas rozfałdowania. Są wskaźnikiem tzw. hydrofobowej hydratacji. Ujemne zmiany pojemności cieplnej wiążą się z podobnym eksponowaniem grup polarnych (DILL, 1990; MURPHY *et al.*, 1990, 1991; LOLADZE *et al.*, 2001). Reorganizacja struktury wody i zmiany jej uporządkowania w pobliżu grup polarnych i niepolarnych także dają znaczący, ale trudny do oszacowania wkład do zmian pojemności cieplnej białka przy jego rozfałdowaniu (PRIVALOV, MAKHATADZE, 1992; WOOLFSON *et al.*, 1993). Zgodnie z otrzymanymi parametrami dopasowania, przy rozfałdowaniu fragmentu albuminy, dla którego proces ten przebiega w zakresie najniższych temperatur, następuje dodatnia zmiana pojemności cieplnej zarówno dla odtłuszczonej, jak i nieodtłuszczonej formy albuminy (rys. 17). Oznacza to przewagę efektu związanego z odsłanianiem grup hydrofobowych

najmniej trwałej termicznie podjednostki makromolekuły. Wartość ΔC_{p1} okazała się niezależna od stężenia etanolu w przypadku HSA, natomiast dla HSAf nieznacznie wyższa przy wyższych stężeniach denaturanta. Bliska zera wartość ΔC_{p2} wskazuje na równoważenie się efektów pochodzących od grup polarnych i niepolarnych bądź na małe zmiany w hydratacji środkowego pod względem trwałości termicznej fragmentu HSA. W przypadku HSAf wartość ΔC_{p2} w roztworach etanolu wykazuje znak ujemny, podobnie jak ΔC_{p3} . Także dla HSA obserwowana jest ujemna zmiana pojemności cieplnej trzeciego przejścia, sugerując istotne przeorganizowanie grup polarnych przy rozfałdowaniu najbardziej trwałej termicznie części albuminy. Z przedstawionych danych wynika, że różnice pomiędzy termicznym rozfałdowaniem albuminy nieodtłuszczonej oraz pozbawionej kwasów tłuszczowych w obecności etanolu dotyczą głównie podjednostki albuminy reprezentowanej przez środkowe przejście składowe. Podjednostka ta prawdopodobnie może być utożsamiona z centralną domeną II lub fragmentem cząsteczki albuminy zawierającym tę domenę.

7. Skutki ekspozycji roztworów wodnych albuminy na wybrane zakresy promieniowania elektromagnetycznego

7.1. Wpływ promieniowania o częstotliwości radiowej na trwałość konformacji albuminy wołowej

W otoczeniu człowieka znajduje się wiele źródeł promieniowania o częstotliwości radiowej (RF), włączając tak powszechne jak: nadajniki radiowe i telewizyjne, łącza telekomunikacyjne, łączność satelitarna, telefony komórkowe i ich stacje bazowe. Wpływ tego promieniowania na obiekty biologiczne badany jest w różnych aspektach z powodu zagrożeń, jakie może ono nieść we współczesnym świecie (AGNIR, 2003; CROFT *et al.*, 2002; DONNELAN *et al.*, 1997). Promieniowanie RF zalicza się do zakresu promieniowania niejonizującego, ponieważ nawet to o największej częstotliwości, czyli około 300 GHz, ma energię o trzy rzędy wielkości za małą do spowodowania jonizacji materii. Energia kwantu takiego promieniowania, 1,2 meV, jest zbyt mała, by zniszczyć wiązania molekularne. Efekty termiczne związane z narażeniem na wysoki poziom promieniowania RF są stosunkowo dobrze poznane i udokumentowane (*European Commission...*, 2006; POLK, POSTOV, 1996; REPACHOLI, 1998; VALBERG, 1997). W ostatnich latach uwagę przyciągają tzw. efekty nietermiczne („atermiczne”), o których istnieniu w zakresie częstotliwości od kilku MHz do kilkuset GHz pojawiają się doniesienia, jednakże są one niespójne, a same efekty zwykle małe, na poziomie tzw. „szumu statystycznego”, trudne do odtworzenia i powtórzenia (AGNIR, 2003; BARTERI *et al.*, 2005; *European Commission...*, 2006; VALBERG, 1997; ZOTTI-MARTELLI *et al.*, 2005). Kontrowersyjność występowania takich efektów wynika także z braku liniowej relacji pomiędzy dawką a odpowiedzią na nią.

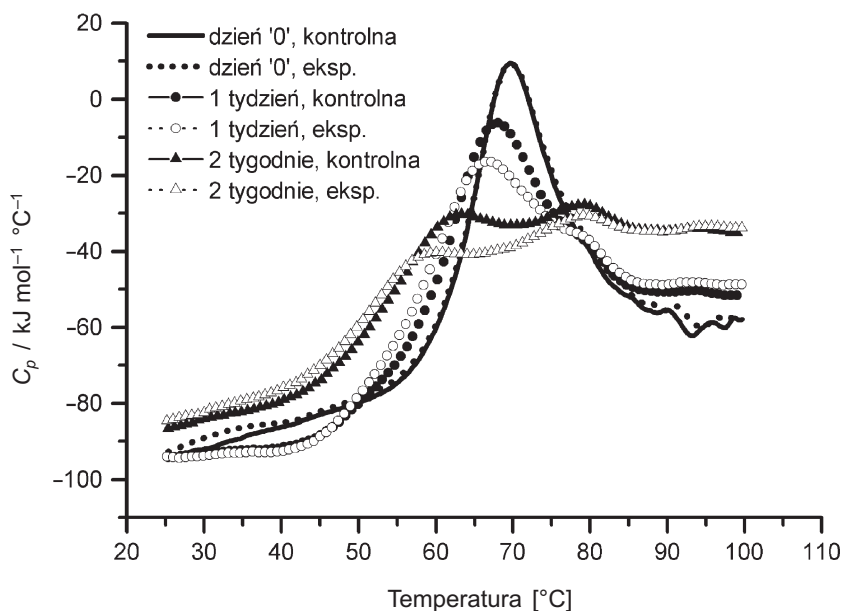
Warunki „atermiczne” ekspozycji rozumiane są jako takie, które nie powodują wzrostu temperatury (w granicach błędu pomiarowego), mierzonej dostępnymi metodami termometrii. Efekty nietermiczne mogą powstawać na skutek wielu różnych oddziaływań, które zachodzą pomiędzy polem elektrycznym i różnymi składnikami materiału biologicznego. Pojawiła się koncepcja, że promieniowanie RF może zmieniać konformacje białek (PORCELLI *et al.*, 1997; BOHR, BOHR, 2000 a; LAURENCE *et al.*, 2000, 2003). Łańcuch molekuly białka przyjmuje różne konformacje, z których każda ma określony moment dipolowy i energię. Pewne konformacje mogą mieć podobne energie ze stosunkowo małymi barierami potencjału między nimi. Te stany konformacyjne zatem mogą oddziaływać, tworząc zbiór stanów sprzężonych, rozdzielonych energiami odpowiadającymi częstościom rzędu GHz. Przejścia między nimi mogą być zrealizowane przez ekspozycję na promieniowanie RF w zakresie częstości GHz. Prowadząc do zmian w pofałdowaniu (a także w rozfałdowaniu) białka, wywołują one zatem pewne efekty biologiczne. H. BOHR i J. BOHR (2000 b) wykazali, że promieniowanie mikrofalowe zmienia kinetykę procesów fałdowania i rozfałdowania pewnych białek, w szczególności β -laktoglobuliny, przyspieszając je, gdy zachodzą w kierunku stanu równowagi. Dokonano ważnego spostrzeżenia, że nawet bardzo małe zmiany w konformacji białek mogą pociągać za sobą znaczące zmiany funkcji biologicznych (KOSHLAND, 1998). Wykrycie tych niewielkich zmian konformacyjnych może być zatem bardzo istotne.

Korzystając z możliwości śledzenia przemian konformacyjnych białek z zastosowaniem techniki różnicowej mikrokalorymetrii skaningowej, przeanalizowano wpływ promieniowania radiowego (RF) z zakresu 3—250 MHz na przebieg termicznego rozfałdowania albuminy wołowej nieodtłuszczonej w roztworach wodnych (MICHNIK *et al.*, 2004). Poddając próbki 30-minutowej ekspozycji (opisanej w pracy MICHNIK *et al.*, 2004) na działanie promieniowania radiowego o kilku wybranych częstościach, nie stwierdzono ich istotnej zmiany temperatury. Biorąc pod uwagę błąd pomiaru, różnice pomiędzy temperaturą roztworów białka przed i po ekspozycji na promieniowanie RF nie były większe od 0,2°C. Warunki ekspozycji można w związku z tym uznać za „atermiczne”.

W pomiarach kalorymetrycznych nie zaobserwowano żadnych natychmiastowych efektów napromieniowania roztworów albuminy. Krzywe DSC próbek napromieniowanych i kontrolnych, zarejestrowane w dniu ekspozycji, nie różniły się (rys. 18), co świadczy o tym, iż proces termicznego rozfałdowania makromolekuly albuminy nie uległ zmianie wskutek napromieniowania. Nasuwa się w związku z tym także wniosek, że 30-minutowa ekspozycja na promieniowanie RF o częstości < 250 MHz nie powoduje zmiany konformacji białka. Nie jest to jednak wniosek ostateczny z przeprowadzonych badań. Kierując się oszczędnością, ze względu na brak oczekiwanego efektu, wykorzystano przygotowane próbki do rozpoczętych wcześniej badań zmian zachodzących w roztworach albuminy w czasie. Badania DSC próbek napromieniowanych i nienapro-

mieniowanych, przechowywanych w temperaturze około 4°C, powtórzono po kilku dniach, a następnie tygodniach od dnia rozpoczęcia eksperymentu. Przyniosły one zaskakujący, niespodziewany efekt, zachęcający do kontynuacji obserwacji.

Krzywe DSC kilkudniowych próbek napromieniowanych i kontrolnych zaczęły się różnić, różnice te narastały przez około 2 tygodnie, a następnie stopniowo zanikały. Wpływ napromieniowania ujawnił się zatem dopiero podczas śledzenia zmian czasowych zachodzących w roztworach białka. Na rys. 18 zilustrowano przykładowe krzywe DSC dla próbek poddanych działaniu promieniowania o częstotliwości 30 MHz i kontrolnych, uzyskane w dniu ekspozycji (dzień 0'') oraz po tygodniu i po dwóch tygodniach. Generalnie czasowy przebieg zmian wydaje się bardzo podobny, ale zachodzą one szybciej (pojawiają się z wyprzedzeniem) w roztworach poddanych działaniu promieniowania niż w kontrolnych. W zerowym dniu eksperymentu kształt obydwu krzywych DSC jest niemal identyczny. Z upływem czasu pik odzwierciedlający proces termicznej denaturacji albuminy poszerza się, jego intensywność maleje, a maksimum piku przesuwa się w kierunku niższych temperatur. Po około 2 tygodniach przejście staje się bimodalne. Obserwacje te sugerują, że z upływem czasu proces rozfałdowania makromolekuły rozciąga się w szerszym zakresie temperatur, przejście staje się mniej kooperatywne. Następuje prawdopodobnie osłabienie sił stabilizujących prawidłową strukturę białka, nasila się proces jego agregacji.



Rys. 18. Charakterystyczne zmiany krzywych DSC, zachodzące w czasie przechowywania roztworów BSA poddanych ekspozycji na promieniowanie RF o częstotliwości 30 MHz (eksp.) i kontrolnych (szybkość skanowania 1°C min^{-1}) (opracowanie własne)

Pomiary z zastosowaniem źródeł o częstotściach 10 MHz i 30 MHz wykonano dodatkowo w celu silniejszego potwierdzenia i uzupełnienia opublikowanych wyników badań (MICHNIK *et al.*, 2004). Podstawowe parametry charakteryzujące ekspozycję na promieniowanie RF: f — częstotliwość, E — natężenie pola elektrycznego, H — natężenie pola magnetycznego, S — gęstość strumienia energii (mocy) podano w tabeli 10 (wartości E i H zmierzono z około 10% dokładnością). Pozostałe warunki eksperymentu były takie same, jak opisane w pracy MICHNIK *et al.*, 2004.

Tabela 10

Podstawowe parametry charakteryzujące ekspozycję roztworów albuminy na promieniowanie RF

f / MHz	$E / 10^2 \text{ V m}^{-1}$	$H / 10^2 \text{ A m}^{-1}$	$S / 10^4 \text{ W m}^{-2}$
5	163	3,3	532
10	132	2,6	347
30	17	0,4	5,8
247	113	2,3	258

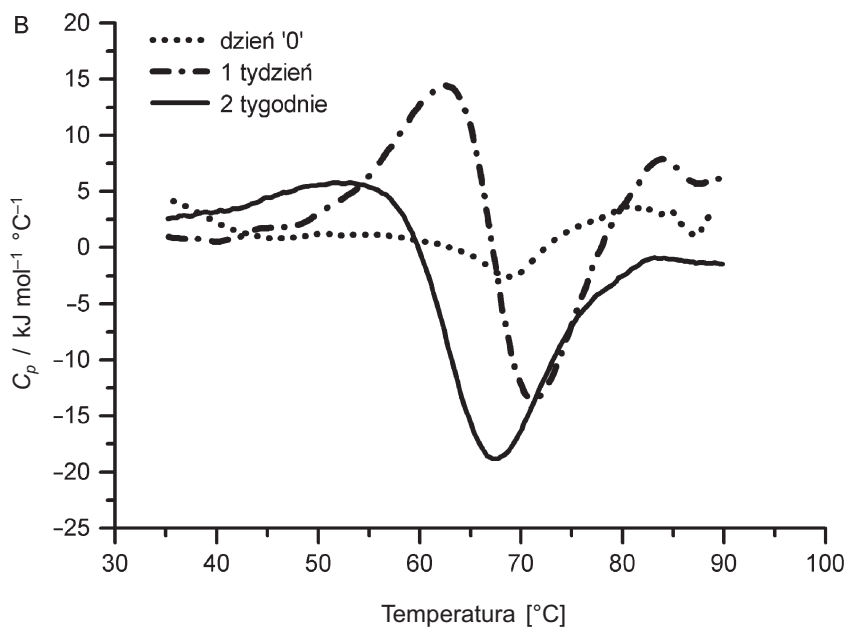
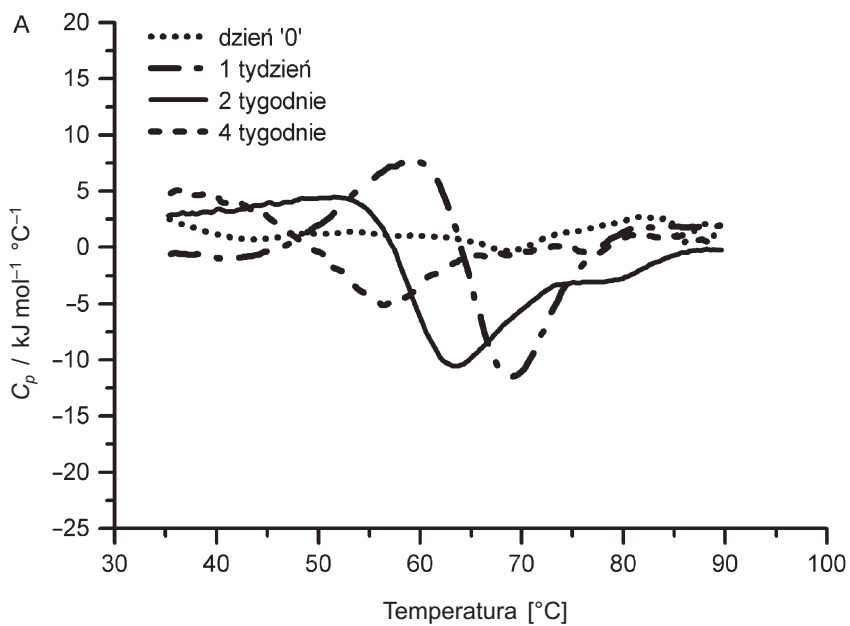
Tabela 11

Uśrednione parametry przejścia (\pm błąd standardowy średniej) związanego z termicznym rozkładowaniem BSA

Czas	Częstotliwość promieniowania	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	$HHW / ^\circ\text{C}$
Dzień „0”		$69,1 \pm 0,1$	910 ± 30	$10,7 \pm 0,1$
Po 1 tygodniu	brak	$68,0 \pm 0,4$	960 ± 30	$12,3 \pm 0,5$
	5 MHz	$66,6 \pm 0,4$	900 ± 15	$12,8 \pm 0,4$
	10 MHz	$67,4 \pm 0,6$	945 ± 19	$13,7 \pm 0,7$
	30 MHz	$65,9 \pm 0,8$	987 ± 10	$15,7 \pm 0,9$
	247 MHz	$67,8 \pm 0,6$	920 ± 10	$11,5 \pm 0,5$

Wszystkie wyniki dodatkowego eksperymentu były zgodne z wynikami wcześniejszymi, opublikowanymi w artykule MICHNIK *et al.*, 2004. W tabeli 11 zestawiono wybrane z opublikowanych wyników, z nowymi, otrzymanymi dla 10 MHz i 30 MHz. Uśrednione parametry (T_m — temperatura maksimum piku, ΔH — zmiana entalpii, HHW — szerokość piku w połowie jego wysokości) endotermicznego przejścia, związanego z termicznym rozkładowaniem BSA sugerują, że po tygodniu największe zmiany T_m i HHW nastąpiły w roztworach ekspozycyjnych na promieniowanie 30 MHz. Warto zwrócić uwagę, że wartość S (tabela 10) była w tym przypadku najmniejsza.

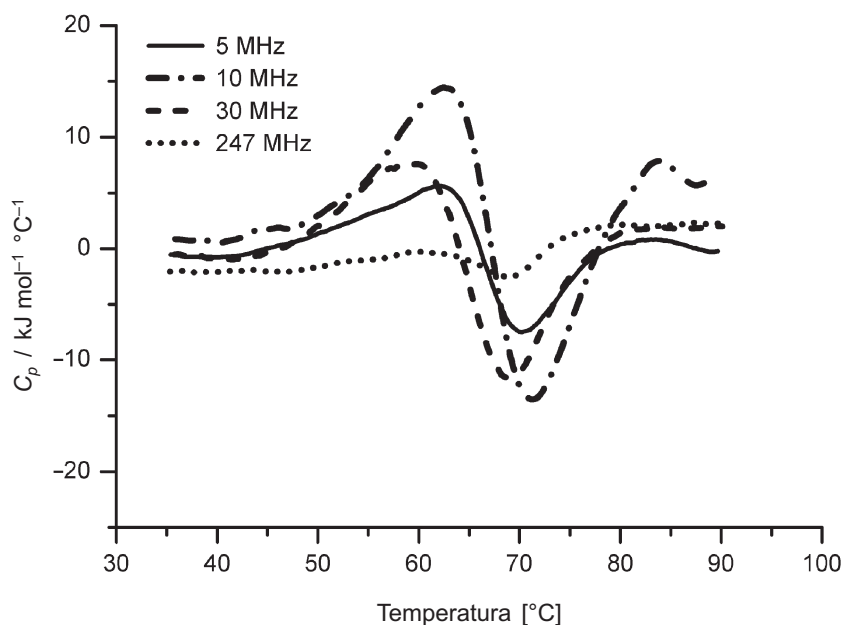
Większą wartość informacyjną przy porównywaniu efektów napromieniowania różnymi częstotściami niosą krzywe różnicowe pomiędzy próbkami napromieniowanymi i kontrolnymi. Na rys. 19 A i B zilustrowano takie krzywe odpo-



Rys. 19. Różnicowe krzywe DSC par próbek BSA: eksponowana na promieniowanie o częstotliwości 30 MHz (A) lub 10 MHz (B) oraz nienapromieniowana, w różnym czasie od dnia przygotowania roztworów i ich ekspozycji (opracowanie własne)

wiednio dla częstotliwości 30 MHz i 10 MHz. Odpowiadające sobie pod względem czasu przechowywania próbek różnice są większe przy częstotliwości 10 MHz niż 30 MHz. Dodatkowo porównanie intensywności krzywych na rys. 19 A wskazuje, że duże różnice pomiędzy próbkami eksponowanymi na RF i kontrolnymi, rejestrowane po 1—2 tygodniach, zmniejszają się po dłuższym czasie obserwacji (na rysunku pokazano efekt po upływie 4 tygodni).

Z zestawienia krzywych różnicowych pomiędzy przechowywanymi 1 tydzień próbkami napromieniowanymi i nienapromieniowanymi (rys. 20) wynika, że największe różnice pojawiły się przy częstotliwości 10 MHz, a najmniejsze przy 247 MHz. Charakter zmian dla 5 MHz i 10 MHz jest podobny, ale krzywe różnią się intensywnością. Krzywe różnicowe dla wyższych częstotliwości są przesunięte w stronę niższych temperatur.



Rys. 20. Różnicowe krzywe DSC inkubowanych przez 1 tydzień par próbek BSA: eksponowanych na promieniowanie o częstotliwościach: 5, 10, 30, 247 MHz oraz kontrolnych (opracowanie własne)

Podsumowując zaprezentowane wyniki można stwierdzić, że proces zmian czasowych albuminy w roztworach eksponowanych na promieniowanie RF postępował szybciej, mimo że zaraz po jej napromieniowaniu nie zaobserwowano żadnych różnic między próbką napromieniowaną i kontrolną, co wynikało z niezmiennego profilu termicznej denaturacji. Przyczyna szybszego tempa zmian czasowych w roztworach albuminy poddanych działaniu promieniowania RF jest niejasna. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe mówiące o generowaniu stresu oksydacyjnego na skutek wzrostu wolnych rodników w układach bio-

logicznych narażonych np. na promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu stosowanego w telefonii komórkowej (ILHAN *et al.*, 2004; OZGUNER *et al.*, 2005; MERAL *et al.*, 2007), można zaobserwowany efekt przypisać właśnie temu zjawisku.

Porównując efekty wywołane przez ekspozycje o najbardziej zbliżonych parametrach E, H oraz S (tabela 10), czyli na promieniowanie o częstotliwościach 10 MHz i 247 MHz, okazuje się, że promieniowanie o niższej częstotliwości wywiera znacznie silniejszy wpływ na roztwory BSA. Brak zmian (w granicach błędu pomiarowego) temperatury roztworów w wyniku 30-minutowej ekspozycji na promieniowanie RF oraz silniejszy wpływ promieniowania o niższej częstotliwości wskazują na nietermiczny charakter zaobserwowanego efektu.

Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC albuminy poddanej działaniu promieniowania RF

Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC pozwoliła na zbadanie wpływu promieniowania RF na przejścia składowe wyodrębnione w procesie termicznego rozfałdowania albuminy surowicy. Wstępna analiza z zastosowaniem modelu niedwustanowego przy założeniu jednego przejścia pokazała, że stosunek entalpii kalorymetrycznej do entalpii van't Hoffa wynosi około 3 w przypadku próbek świeżych. Dla próbek przechowywanych w warunkach chłodniczych (w temperaturze około 4°C) przez 1—2 tygodnie (nazywanych dalej próbkami inkubowanymi), jego wartość mieści się w przedziale między 4 a 5. Zgodnie z sugerowaną w związku z tym minimalną liczbą kooperatywnych podjednostek zastosowano model dwustanowy z trzema niezależnymi przejściami. Model ten pozwolił uzyskać dobre dopasowanie krzywych dla próbek świeżych, jak również inkubowanych przez 1 tydzień.

Wyniki dotyczące zmian entalpii ΔH_i ($i = 1, 2, 3$) wyznaczonych dla nie-napromieniowanych próbek świeżych i inkubowanych 1 tydzień przedstawiono w tabeli 12, a wartości temperatur przejścia T_{mi} ($i = 1, 2, 3$) dla próbek świeżych i inkubowanych, w różnych warunkach ekspozycji, pokazano w tabeli 13.

Tabela 12

Porównanie zmian entalpii ΔH_i ($i = 1, 2, 3$) uzyskanych w modelu dwustanowym z trzema niezależnymi przejściami dla procesu termicznej denaturacji nienapromieniowanych i napromieniowanych roztworów BSA: świeżych (dzień „0”) i po 1 tygodniu

Wyszczególnienie	Zmiana entalpii ΔH_i / kJ mol ⁻¹					
	ΔH_1		ΔH_2		ΔH_3	
	dzień „0”	1 tydzień	dzień „0”	1 tydzień	dzień „0”	1 tydzień
Wartość średnia	260	249	393	375	273	267
Przedział ufności (95%)	(243;276)	(234;264)	(358;429)	(346;405)	(256;290)	(248;287)

Tabela 13

Temperatury przejścia (średnia \pm maksymalny błąd standardowy średniej) uzyskane przy dopasowaniu krzywych DSC w ramach modelu dwustanowego z trzema niezależnymi przejściami

Czas	Częstotliwość promieniowania	$T_1 / ^\circ\text{C} \pm 0,6$	$T_2 / ^\circ\text{C} \pm 0,3$	$T_3 / ^\circ\text{C} \pm 0,5$
Dzień „0”		66,1	69,0	73,7
Po 1 tygodniu	brak	63,8	67,7	73,7
	3,6 MHz	61,0	67,0	75,3
	5 MHz	59,8	66,5	73,2
	10 MHz	58,8	66,5	74,2
	30 MHz	57,0	65,0	73,0
	247 MHz	63,2	68,2	73,4

W przypadku próbek inkubowanych przez 2 tygodnie model dwustanowy nie dał dobrych rezultatów nawet przy założeniu 4 i 5 podjednostek. Zadowalające dopasowanie krzywych DSC otrzymano w modelu niedwustanowym z minimum czterema przejściami składowymi. Rozważając kolejne kroki analizy dekonwolucyjnej, polegające na zwiększaniu liczby zakładanych przejść składowych, uzyskuje się zwykle lepszą jakość dopasowania, o czym świadczy mniejsza wartość χ^2 . Założenie o istnieniu określonej liczby stanów pośrednich powinno mieć jednak swoje uzasadnienie.

Porównując pokazane w tabeli 13 wartości parametrów trzech przejść składowych wyodrębnionych w modelu dwustanowym dla eksponowanych na promieniowanie RF i kontrolnych próbek BSA można zauważyć, że po tygodniu temperatury przejścia dwóch pierwszych pików (numerując je od niższych do wyższych temperatur) maleją, a trzeciego praktycznie nie zmienia się. Uzupełniające dane dotyczące częstotliwości 10 MHz i 30 MHz dobrze wpasowują się w te z pierwszego etapu eksperymentu. Wskazują one, że wyznaczone dla przechowywanych tydzień roztworów BSA temperatury T_1 i T_2 maleją ze wzrostem częstotliwości promieniowania od 3,6 MHz do 30 MHz, natomiast wartość temperatury T_3 nie zależy od częstotliwości. Temperatura T_1 dla albuminy eksponowanej na promieniowanie 30 MHz przesuwają się po tygodniu o 9°C , a temperatura T_2 o 4°C w stosunku do temperatur wyjściowych (z dnia „0”), podczas gdy odpowiednie przesunięcia dla roztworów, które nie były napromieniowane, wynoszą $2,3^\circ\text{C}$ oraz $1,3^\circ\text{C}$. Wykazano, że różnice te, jak również różnice pomiędzy inkubowanymi przez 1 tydzień próbkami eksponowanymi na promieniowanie o częstościach: 3,6 oraz 5 i 10 MHz a kontrolnymi są istotne statystycznie ($p < 0,05$). Brak natomiast znaczących różnic pomiędzy temperaturami przejść składowych dla próbki eksponowanej na promieniowanie o częstotliwości 247 MHz a tymi dla nienapromieniowanej.

Wyniki analizy dekonwolucyjnej wskazują, że charakterystyczne zmiany ujawniające się z czasem w kształcie krzywych DSC dla przechowywanych

w temperaturze 4°C roztworów BSA w początkowym etapie dotyczą głównie podjednostek makromolekuły rozfałdowujących się w niższych temperaturach. Zgodnie z sugestiami zaproponowanymi przez Autorkę niniejszej pracy, termiczne rozfałdowanie cząsteczki albuminy w roztworach wodnych rozpoczyna się prawdopodobnie od domeny III, czyli od fragmentu zawierającego koniec C, a najbardziej trwała jest domena I. Zakładając słuszność tej koncepcji, najsilniejszy efekt promieniowania RF z omawianego zakresu częstotliwości dotyczyłby domeny III, a nieco słabszy domeny II.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że promieniowanie RF o częstotliwości z zakresu od kilku do kilkudziesięciu MHz wywiera wpływ na termiczne przemiany zachodzące w roztworach wodnych albuminy, choć skutek wpływu ekspozycji na promieniowanie nie jest natychmiastowy. Zastanawiający jest fakt, że dla promieniowania o największej z badanych częstotliwości, 247 MHz, nie stwierdzono tak wyraźnego efektu. Interesujące byłoby przeprowadzenie badań z zastosowaniem źródeł promieniowania o innych częstotliwościach rzędu kilkuset MHz. Warto byłoby także wykonać badania zmian zachodzących w roztworach albuminy metodą DLS (dynamicznego rozpraszania światła).

7.2. Konformacyjna reorganizacja albuminy pod wpływem promieniowania UV

Promieniowanie UV wpływa na wiele procesów biologicznych i chemicznych, aktywizując je w sensie pozytywnym, ale także wywołując efekty niepożądane. W literaturze tematu opisano liczne skutki związane z ekspozycją zwierząt i ludzi na to promieniowanie, zwracając szczególną uwagę na wynikające z tego zagrożenia (CLYDESDALE *et al.*, 2001; *National...*, 2002; LONGSTRETH *et al.*, 1998; MISRA *et al.*, 2005). Biorąc pod uwagę działanie na organizm człowieka, wyróżnia się trzy zakresy tego promieniowania. **UVC**, promieniowanie o najkrótszej długości fali, tj. od 100 nm do 280 nm, ma najwyższą energię, jest silnie rumieniotwórcze, ale jest prawie całkowicie pochłaniane przez warstwę ozonową atmosfery i w normalnych warunkach nie dociera na powierzchnię Ziemi. Promieniowanie **UVB** o długości fali od 280 nm do 315 nm ma bardzo silne właściwości rumieniotwórcze, wzmaga syntezę barwnika skóry i jest odpowiedzialne za oparzenia skóry, a także za efekty fotostarzenia (LONGSTRETH *et al.*, 1998). Powoduje hemolizę erytrocytów ludzkich, wzrost jego dawki zwiększa konwersję hemoglobiny w methemoglobinę (MISRA *et al.*, 2005). **UVA**, promieniowanie o długości 315–400 nm, jest mniej rumieniotwórcze, ale za to bardziej barwnikotwórcze od UVB. Ilość UVA docierająca do powierzchni ziemi jest znacznie większa niż UVB. Wysokie dawki UVA mogą

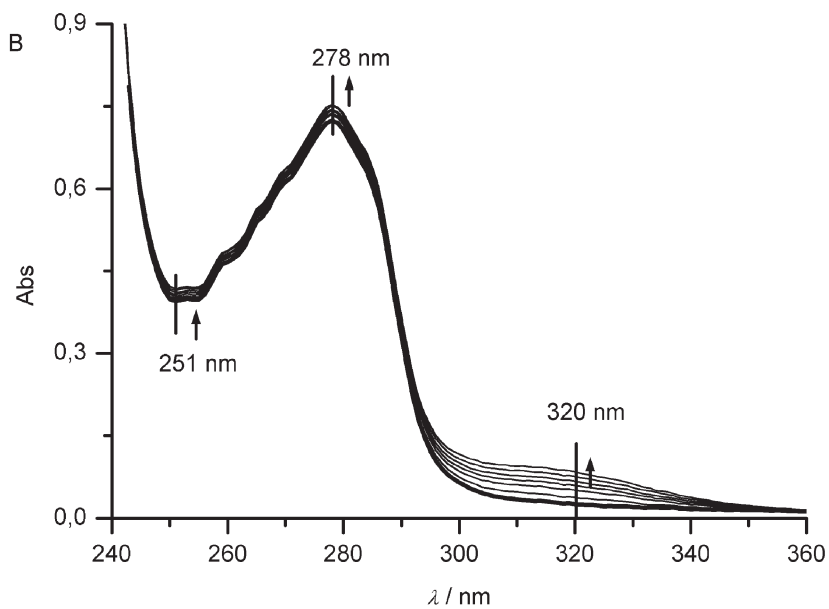
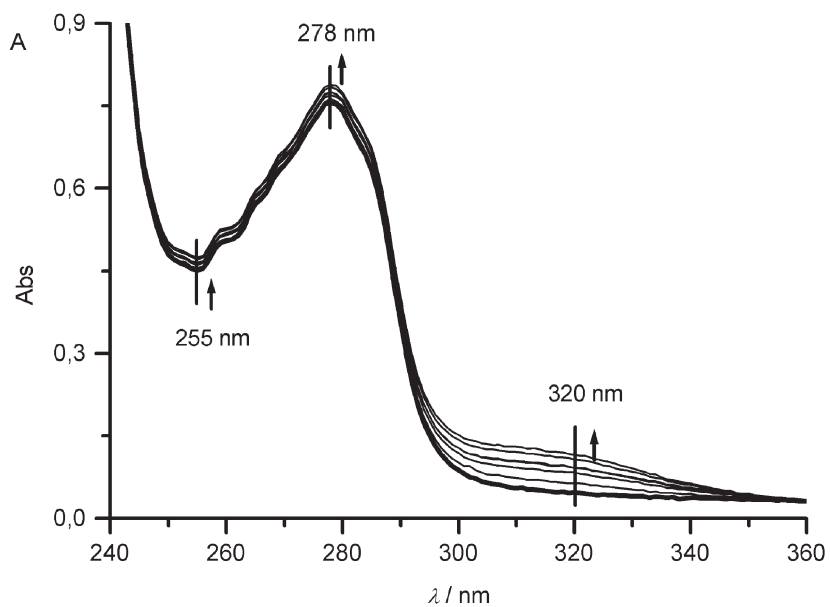
wzmacniać odczyny rumieniowe i zwiększać niekorzystne efekty biologiczne promieniowania UVB. Winę za proces posłonecznego starzenia się skóry przypisywano początkowo głównie promieniowaniu UVB. Obecnie uważa się, że w procesie tym istotną rolę odgrywają również promienie UVA, które oddziałują nie tylko na komórki naskórka, lecz wnikają też głębiej, docierają do skóry właściwej, powodując niekontrolowane modyfikacje w naskórku, uszkadzają włókna kolagenowe w skórze właściwej oraz osłabiają mechanizmy odpornościowe.

Promieniowanie UV jest najsilniejszym aktywatorem wolnych rodników. Jednym z najbardziej niebezpiecznych działań tych cząsteczek jest destrukcja materiału genetycznego komórki. Uwalnianie wolnych rodników prowadzi do stresu oksydacyjnego, którego konsekwencją może być zmiana struktury białek odpowiedzialnych za patomechanizm chorób Alzheimera i Parkinsona.

Zdolność promieniowania UVC do inaktywacji mikroorganizmów, między innymi wirusów, może być wykorzystana w procedurach eliminacji skażeń z produktów biofarmaceutycznych (LOPEZ *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005). Pożądane jest opracowanie metod, które inaktywując wirusy, nie powodują utraty aktywności komponentów białkowych. Testując procedury oparte na napromieniowaniu UV, sprawdza się stopień zachowania aktywności białek. Pewne aspekty działania promieniowania UV na białka są znane. Wiadomo, że generuje ono substancje fluorescencyjne, powoduje polimeryzację, fragmentację, usieciowanie (*cross-linking*), oksydację przez rodniki generowane w wyniku radiolizy wody (ARTYUKHOV *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 1999; DAVIES, DELSIGNORE, 1987). Stwierdzono, że w procesie denaturacji wywołanej ekspozycją białek na promieniowanie UV, ważną rolę odgrywają grupy SH obecne np. w cysteinie czy glutationie (WATANABE *et al.*, 1991). Zaobserwowano podobieństwo pomiędzy skutkami działania promieniowania UVC oraz promieniowania X na roztwory białek (DURCHSCHLAG *et al.*, 1996). Badania fluorescencyjne oraz FT-IR wykazały, że promieniowanie UVC (253,7 nm) wpływa na wiązanie artemisininu do BSA w roztworach wodnych przy fizjologicznym pH (BIAN *et al.*, 2006).

Stosując technikę DSC, zbadano wpływ promieniowania UV na termiczne przemiany konformacyjne albuminy wołowej oraz ludzkiej w roztworach wodnych (MICHNIK, MICHALIK, 2004; MICHNIK *et al.*, 2008). Zakładając, że rozfałdowanie białka, widziane w postaci endotermicznego piku na krzywej DSC, zależy od wyjściowej konformacji makromolekuły, na podstawie obserwacji zmian wywołanych wpływem promieniowania w kształcie i parametrach przejścia termicznego, podjęto próbę wnioskowania o zmianach konformacji białka. Uzupełnieniem przeprowadzonych badań kalorymetrycznych były badania spektroskopowe w zakresie UV.

Albuminę wołową poddano wpływowi promieniowania ultrafioletowego o szerokim spektrum: od UVA do UVC, emitowanego przez lampę kwarcową



Rys. 21. Zmiany w widmach absorpcyjnych HSA (A) i HSAf (B) wywołane 60-minutową ekspozycją (6×10 min) na promieniowanie 254 nm (MICHNIK *et al.*, 2008)

(MICHNIK, MICHALIK, 2004). Drugi rodzaj badań, z zastosowaniem niskociśnieniowej lampy rtęciowej, emitującej głównie promieniowanie o długości fali 254 nm, przeprowadzono dla albuminy ludzkiej. Szczegóły eksperymentu opisano w pracy (MICHNIK *et al.*, 2008). Charakterystyczne zmiany wywoływane promieniowaniem obserwowano zarówno w widmach absorpcyjnych, jak i krzywych DSC albumin, co ilustrują rys. 21 i 22.

Ze wzrostem czasu napromieniowania w widmach UV następował wyraźny, istotny statystycznie dla wszystkich badanych odmian albuminy, wzrost absorpcji: słabszy w zakresie 250—280 nm i silniejszy w zakresie 300—350 nm (rys. 21). Jak wynika z doniesień literaturowych, rozfałdowanie różnych białek w określonych warunkach środowiskowych może objawiać się zarówno wzrostem, jak i spadkiem absorpcji w obszarze widma pochodzącym od aminokwasów aromatycznych. Stwierdzono, że rozfałdowaniu α -chymotrypsyny (0,3 mg/ml, pH 7,0) towarzyszył spadek absorpcji przy 281 nm o około 10% (LOZANO *et al.*, 1997), natomiast przy rozfałdowaniu kutinazy (*cutinase*) (pH 9,6) zaobserwowano znaczący wzrost absorpcji przy 250 nm z powodu jonizacji Tyr odsłoniętych na działanie rozpuszczalnika (MELO *et al.*, 1997). Pod wpływem próżniowego promieniowania UV obserwowano spadek wartości stosunku absorpcji przy 278 nm do absorpcji przy 250 nm dla wołowej albuminy surowicy (ARTYUKHOV *et al.*, 2001) przypisany procesom destrukcji białka w obszarach usytuowania aromatycznych aminokwasów.

W analizie wyników spektroskopowych, poza bezpośrednim monitorowaniem zmian absorpcji przy wybranych charakterystycznych długościach fali, posłużono się parametrami:

1. A_{\max}/A_{\min} — stosunek absorpcji lokalnego maksimum (występującego przy 278 nm) do absorpcji lokalnego minimum (występującego przy 251 nm dla obydwu badanych albumin wołowych (BSAf i BSA) oraz dla HSAf i przy 255 nm dla HSA),
2. $A_{320}^{uv} - A_{320}^0$ — różnica występująca przy 320 nm pomiędzy absorpcją roztworu albuminy eksponowanego przez określoną długość czasu na promieniowanie UV (A_{320}^{uv}) i nienapromieniowanego (A_{320}^0).

Ze wzrostem czasu ekspozycji na promieniowanie UV, zarówno dla albumin wołowych jak i ludzkich, zaobserwowano zmniejszanie się wartości pierwszego oraz wzrost drugiego parametru. Zależności te pokazano w tabeli 14 dla BSA i BSAf, poddanych działaniu promieniowania UV A—C. Zmiany spektroskopowe wywołane w roztworach albuminy ludzkiej promieniowaniem 254 nm (UVC) były wyraźnie słabsze, ale równie charakterystyczne (MICHNIK *et al.*, 2008). Spadek wartości A_{\max}/A_{\min} powiązano ze zmianami intensywności absorpcji światła przez chromofory aminokwasów aromatycznych obecnych w albuminie na skutek zmian strukturalnych. Wzrost wartości drugiego z parametrów był wskaźnikiem nasilającej się pod wpływem promieniowania UV agregacji białka.

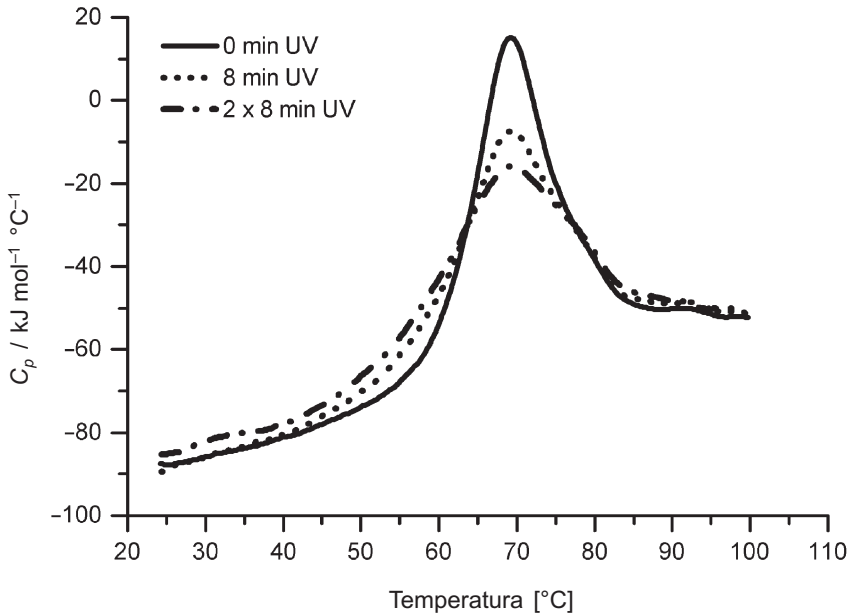
Tabela 14

Zależność parametrów A_{278}/A_{251} i $A_{320}^{uv}-A_{320}^0$ (średnia \pm odchylenie standardowe) od czasu ekspozycji roztworów BSA i BSAf na promieniowanie UV

Ekspozycja UV / min	A_{278}/A_{251}		$A_{320}^{uv}-A_{320}^0$	
	BSA	BSAf	BSA	BSAf
0	2,11 \pm 0,02	2,08 \pm 0,02		
5	2,05 \pm 0,01	2,01 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
10	1,97 \pm 0,02	1,94 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02
15	1,91 \pm 0,02	1,90 \pm 0,04	0,11 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02
30	1,78 \pm 0,02	1,75 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02	0,28 \pm 0,02

Porównując odtłuszczone i nieodtłuszczone formy albumin, zaobserwowano różnice głównie w wartościach parametru $A_{320}^{uv}-A_{320}^0$. Przy wszystkich czasach ekspozycji, zarówno dla albumin ludzkich, jak i wołowych, były one większe w przypadku tych, które pozbawione zostały kwasów tłuszczowych. Statystyczną istotność różnic stwierdzono jednak tylko pomiędzy albuminami wołowymi. Wysłunięto wniosek o większej podatności na agregację pod wpływem promieniowania UV odtłuszczonej formy albuminy.

Na rys. 22 zilustrowano wpływ promieniowania UV A—C na endotermiczne przejście DSC, reprezentujące proces termicznej denaturacji albuminy wołowej. W tabeli 15 zestawiono wartości podstawowych parametrów przejścia



Rys. 22. Krzywe DSC dla roztworów BSA (0,045 mM) nienapromieniowanych (0 min UV) oraz ekspozowanych na promieniowanie UV A—C (opracowanie własne)

dla odtłuszczonej i nieodtłuszczonej albuminy wołowej w zależności od czasów ekspozycji. Łatwo zauważyć, że z wydłużaniem czasu ekspozycji temperatura przejścia nie zmieniała się w granicach błędu doświadczalnego, rosła natomiast jego szerokość połówkowa, a entalpia malała. Bardziej znaczące zmiany entalpii denaturacji wywołane ekspozycją na promieniowanie UV zaszyły dla albuminy pozbawionej kwasów tłuszczowych, 5-minutowe naświetlanie spowodowało spadek ΔH o 5,6% i 18,6%, a 10-minutowe o 23,6% i 36,8% odpowiednio w przypadku BSA i BSaf.

Tabela 15

Zależność średnich wartości (\pm odchylenie standardowe) parametrów przejścia związanego z termiczną denaturacją BSA i BSaf od czasu ekspozycji na promieniowanie UV

Ekspozycja UV / min	$T_m / ^\circ\text{C}$		$HHW / ^\circ\text{C}$		$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	
	BSA	BSaf	BSA	BSaf	BSA	BSaf
0	69,1 \pm 0,2	57,2 \pm 0,2	10,6 \pm 0,3	22,0 \pm 3,4	888 \pm 53	598 \pm 44
5	69,4 \pm 0,5	57,6 \pm 0,3	12,7 \pm 1,1	26,4 \pm 2,9	838 \pm 55	487 \pm 69
10	68,6 \pm 0,5	57,4 \pm 0,4	14,0 \pm 1,4	27,9 \pm 1,4	678 \pm 23	378 \pm 18

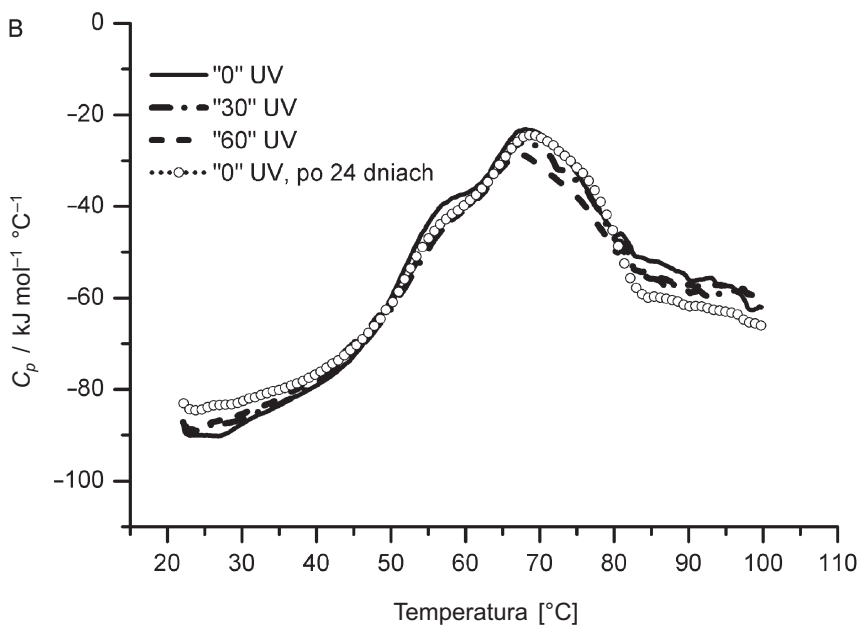
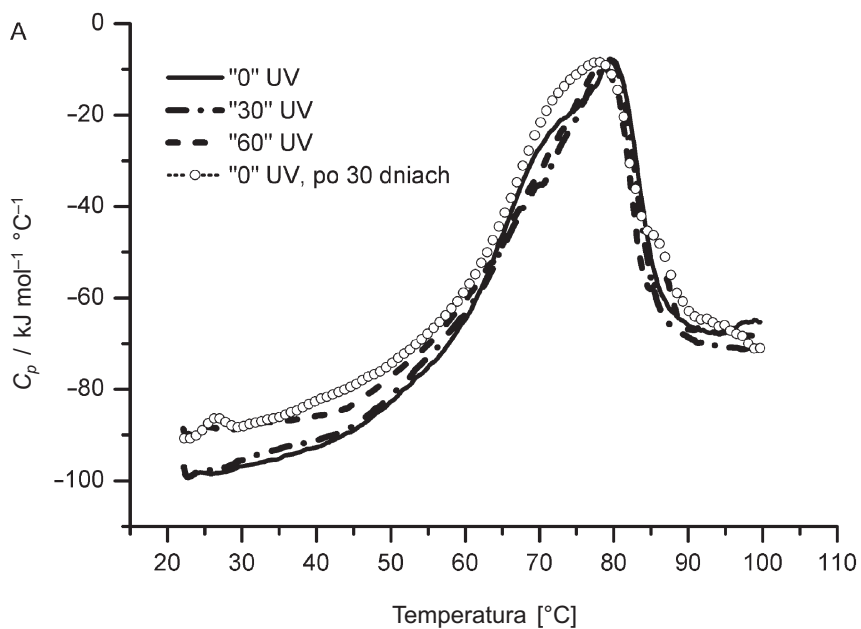
Przykładowe krzywe DSC, ilustrujące wpływ promieniowania UVC 254 nm na przebieg termicznego rozfałdowania dwu form albuminy ludzkiej pokazano na rys. 23, a w tabeli 16 zestawiono wyznaczone parametry termodynamiczne przejścia w zależność od czasu ekspozycji.

Tabela 16

Zależność średnich wartości (\pm błąd standardowy średniej) parametrów przejścia związanego z termiczną denaturacją HSA i HSaf od czasu ekspozycji na promieniowanie UVC

Ekspozycja UVC / min	$T_m / ^\circ\text{C}$		$HHW / ^\circ\text{C}$		$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	
	HSA	HSaf	HSA	HSaf	HSA	HSaf
0	79,5 \pm 0,3	66,8 \pm 0,4	17,7 \pm 0,4	25,1 \pm 0,2	1124 \pm 45	988 \pm 33
30	78,7 \pm 0,3	66,8 \pm 0,2	17,1 \pm 0,6	24,0 \pm 0,3	1052 \pm 16	921 \pm 27
60	78,2 \pm 0,2	63,4 \pm 1,3	16,5 \pm 0,5	24,3 \pm 0,5	1004 \pm 65	774 \pm 31

Porównanie krzywych DSC, zarejestrowanych dla roztworów albuminy ludzkiej w dniu przygotowania i poddania działaniu promieniowania UVC z krzywymi dla roztworów nienapromieniowanych, ale przechowywanych w temperaturze 4°C przez kilka tygodni (rys. 23) wskazuje, że kierunek zmian wywoływanych ekspozycją na promieniowanie i zmian zachodzących podczas przechowywania roztworów jest podobny. Można zauważyć jednakże istotne różnice pomiędzy krzywymi DSC roztworów białka zmienionych wpływem czasu i poddanych promieniowaniu. Pozwalają one wnioskować, że promieniowanie UV nie tylko przyspiesza przebieg zmian czasowych, ale prowadzi do dodatkowych zmian strukturalnych albuminy.



Rys. 23. Krzywe DSC dla roztworów HSA (A) i HSAf (B) nienapromieniowanych (0 UV) oraz eksponowanych na promieniowanie 254 nm, przez 30 lub 60 min (MICHNIK *et al.*, 2008)

Wyniki badań kalorymetrycznych w porównaniu z wynikami badań spektroskopowych UV VIS w większym stopniu ujawniły różnice w reakcji odtłuszczonej i nieodtłuszczonej albuminy ludzkiej na promieniowanie UVC. Pojawiły się one już w podstawowych parametrach opisujących rozważane przejście termicznej denaturacji albuminy. Wydłużanie czasu ekspozycji roztworów albuminy na promieniowanie powodowało nieznaczne, ale istotne statystycznie obniżenie temperatury przejścia HSA oraz wyraźne zmniejszenie entalpii denaturacji dla HSAf (tabela 16). Zmiana wyjściowego stanu białka przez jego napromieniowanie wywoływała zatem zmianę dwóch różnych parametrów termodynamicznych, biorąc pod uwagę albuminę nieodtłuszczonej i pozbawioną kwasów tłuszczowych. Zaobserwowany spadek wartości ΔH dla HSAf potwierdza wniosek z badań spektroskopowych o zintensyfikowanej agregacji tej formy białka pod wpływem promieniowania UV.

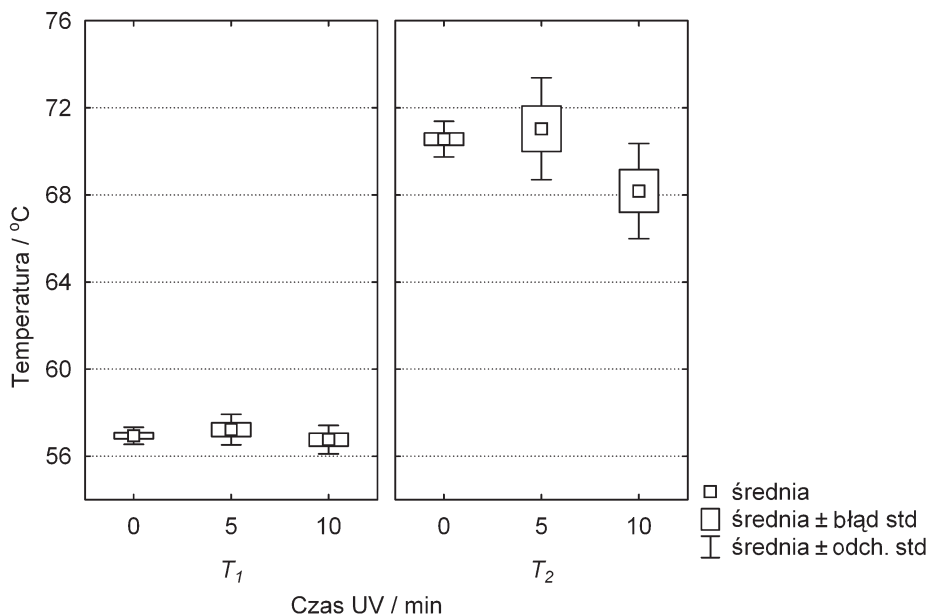
Analiza dekonwolucyjna krzywych DSC albuminy zmienionej działaniem promieniowania UV

Aby uzyskać informacje o wpływie promieniowania UVC na cząsteczkę albuminy na poziomie molekularnym, przeprowadzono analizę dekonwolucyjną krzywych DSC albuminy zmienionej działaniem tego promieniowania. Wykorzystując wnioski przedstawione w rozdziale 5, dokonano wyboru modeli najlepiej opisujących proces termicznego rozkładowania albuminy. Dla odtłuszczonej albuminy wołowej zastosowano model dwustanowy (z $\Delta C_p = 0$) zakładający dwa przejścia składowe, a dla albuminy wołowej nieodtłuszczonej i dla albumin ludzkich model dwustanowy z trzema przejściami składowymi, przy czym dla albumin ludzkich w dwóch wersjach: z $\Delta C_p = 0$ oraz z $\Delta C_p \neq 0$.

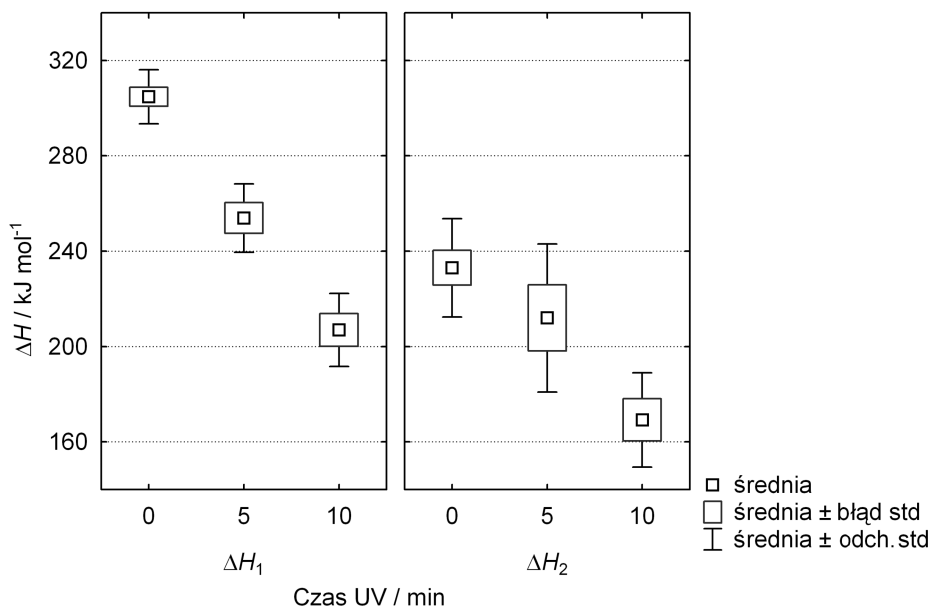
Wyniki uzyskane dla BSAf zaprezentowano na rys. 24 i 25, a dla BSA w tabeli 17.

Analiza statystyczna uzyskanych parametrów dopasowania dla BSA wykazała istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami: 1) T_1 , ΔH_1 dla roztworów: nienapromieniowanego i napromieniowanego 5 min, nienapromieniowanego i napromieniowanego 10 min, 2) T_2 , ΔH_2 , T_3 dla roztworów: nienapromieniowanego i napromieniowanego 10 min, napromieniowanego 5 min i napromieniowanego 10 min. Oznacza to wyraźne obniżenie temperatur przejścia wszystkich trzech składowych (największe pierwszej) oraz spadek wartości ΔH_i dwóch pierwszych przejść składowych pod wpływem promieniowania UV (szybszy, bo już po pierwszych 5 min dla przejścia pierwszego). Obserwowane przesunięcia temperatur T_{mi} są warte podkreślenia ze względu na brak (w granicach błędów) zmiany temperatury T_m całego przejścia (tabela 15).

W przypadku BSAf nie stwierdzono żadnych statystycznie istotnych różnic ani dla T_1 , ani dla T_2 , natomiast wartości ΔH_1 różniły się znacząco pomiędzy



Rys. 24. Temperatury T_{mi} ($i = 1,2$) dla BSAf otrzymane w modelu dwustanowym (opracowanie własne)



Rys. 25. Zmiany entalpii ΔH_i ($i = 1,2$) dla BSAf otrzymane w modelu dwustanowym (opracowanie własne)

Tabela 17

Wpływ czasu ekspozycji na promieniowanie UV A-C na parametry termodynamiczne (\pm odchylenie standardowe) uzyskane w ramach modelu dwustanowego przy założeniu trzech niezależnych przejść składowych dla procesu termicznego rozkładowania BSA

Ekspozycja UV / min	$T_1 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_1 / \text{kJ mol}^{-1}$	$T_2 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_2 / \text{kJ mol}^{-1}$	$T_3 / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_3 / \text{kJ mol}^{-1}$
0	66,1 \pm 1,8	245 \pm 31	69,0 \pm 0,3	403 \pm 39	73,4 \pm 1,6	275 \pm 24
5	63,4 \pm 1,8	197 \pm 39	68,8 \pm 0,2	358 \pm 23	72,4 \pm 1,4	279 \pm 32
10	61,3 \pm 2,8	159 \pm 13	67,6 \pm 0,9	269 \pm 45	70,5 \pm 0,8	272 \pm 13

wszystkimi grupami określonymi przez różne czasy ekspozycji. Dla ΔH_2 statystycznie istotna różnica wystąpiła tylko pomiędzy BSAf nienapromieniowaną i napromieniowaną 10 min.

Wyniki te sugerują, że w pierwszej fazie działania promieniowanie UV wywiera silniejszy wpływ na C-końcową część cząsteczki albuminy wołowej, obejmującą domenę III i większą część domeny II, a słabiej oddziałuje z N-końcowym, bardziej zwartym fragmentem molekuly. Odmienny charakter przedyskutowanych zmian parametrów termodynamicznych przejść składowych procesu termicznego rozkładowania BSA i BSAf, wyodrębnionych w ramach zastosowanych modeli, wskazuje na różnice w reakcji obydwu form albuminy na promieniowanie UV.

Analiza krzywych DSC albumin ludzkich HSA i HSAf w ramach modelu dwustanowego z $\Delta C_p = 0$ przy założeniu trzech niezależnych przejść składowych pozwoliła uzyskać parametry dopasowania, których średnie wartości zaprezentowano w tabelach 18 i 19. Zestawione w nich wyniki pokazują, że

Tabela 18

Zależność temperatur przejścia (średnia \pm odchylenie standardowe) trzech składowych procesu termicznego rozkładowania HSA i HSAf od czasu ekspozycji na promieniowanie UVC uzyskane w ramach modelu dwustanowego ($\Delta C_p = 0$)

Ekspozycja UV / min	$T_1 / ^\circ\text{C}$		$T_2 / ^\circ\text{C}$		$T_3 / ^\circ\text{C}$	
	HSA	HSAf	HSA	HSAf	HSA	HSAf
0	66,0 \pm 1,4	55,0 \pm 1,0	72,1 \pm 0,5	64,3 \pm 1,3	79,8 \pm 0,4	71,9 \pm 1,3
30	62,0 \pm 0,6	54,7 \pm 0,4	71,4 \pm 0,2	64,1 \pm 1,0	79,2 \pm 0,2	71,7 \pm 1,3
60	59,2 \pm 1,8	53,8 \pm 1,0	69,9 \pm 0,9	63,5 \pm 1,3	78,2 \pm 0,3	70,9 \pm 1,6

wszystkie temperatury T_{mi} ($i = 1, 2, 3$) przejść składowych w przypadku HSA i wszystkie wartości zmian entalpii ΔH_i w przypadku HSAf maleją ze wzrostem czasu ekspozycji na promieniowanie. Istotność efektu potwierdzono analizą statystyczną.

Zaskakująco duża wydaje się kilkustopniowa zmiana wartości T_{mi} (dla T_1 aż około 7°C) w porównaniu z ogólnym przesunięciem temperatury przejścia tylko o $1,3^\circ\text{C}$ (tabela 16) w wyniku 60-minutowej ekspozycji na promieniowanie

Tabela 19

Zależność zmian entalpii (średnia \pm odchylenie standardowe) dla trzech składowych procesu termicznego rozfałdowania HSA i HSAf od czasu ekspozycji na promieniowanie UVC uzyskane w ramach modelu dwustanowego ($\Delta C_p = 0$)

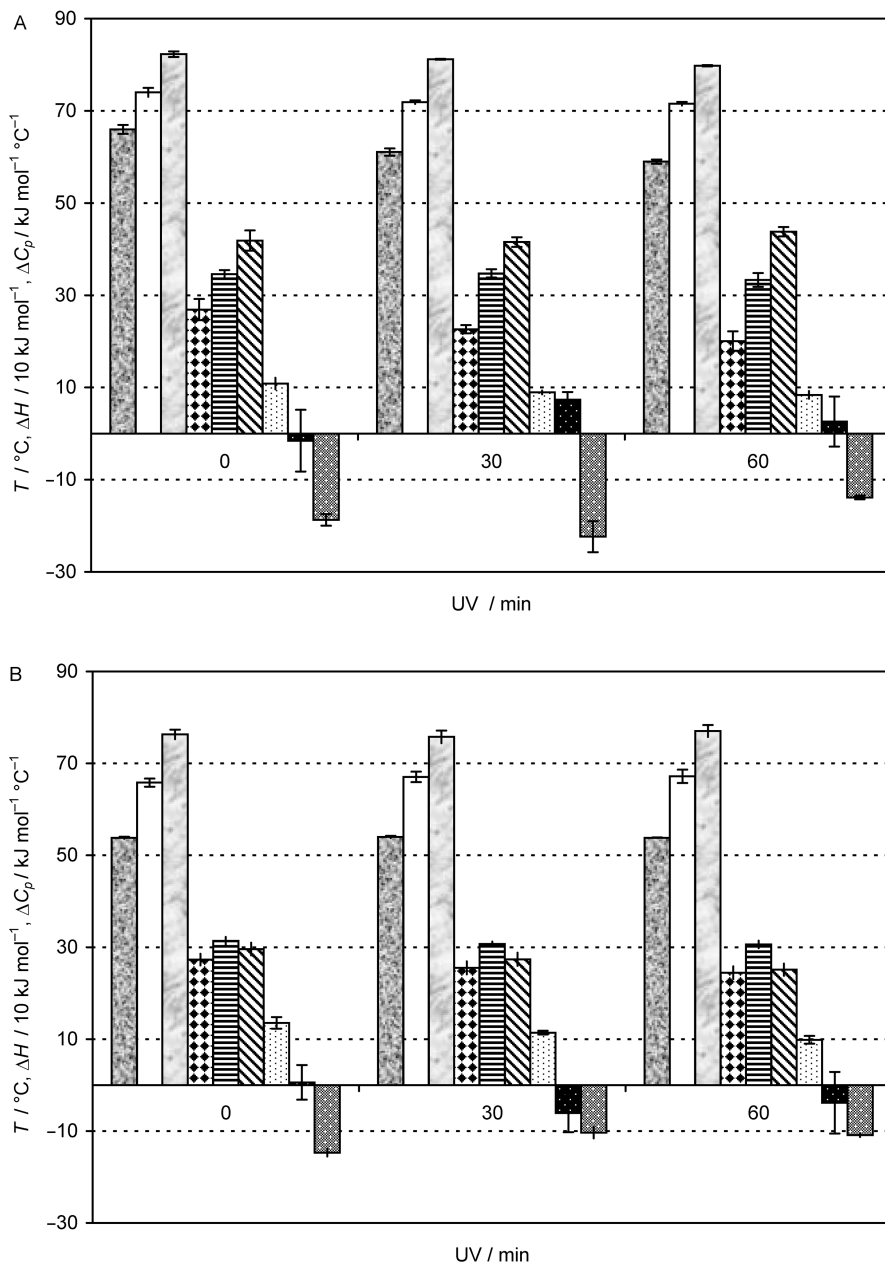
Ekspozycja UV / min	$\Delta H_1 / \text{kJ mol}^{-1}$		$\Delta H_2 / \text{kJ mol}^{-1}$		$\Delta H_3 / \text{kJ mol}^{-1}$	
	HSA	HSAf	HSA	HSAf	HSA	HSAf
0	253 \pm 43	313 \pm 29	374 \pm 38	333 \pm 32	456 \pm 36	347 \pm 48
30	261 \pm 20	273 \pm 33	375 \pm 25	304 \pm 26	457 \pm 17	309 \pm 30
60	252 \pm 38	229 \pm 37	376 \pm 29	271 \pm 37	452 \pm 33	261 \pm 27

o długości fali 254 nm. Sugeruje ona dużą zmianę termostabilności fragmentu cząsteczki HSA rozfałdowującego się w zakresie najniższych temperatur, powodowaną przez promieniowanie UVC.

Analizując zmiany wartości ΔH_i (tabela 19) przejść składowych dla albuminy ludzkiej wolnej od kwasów tłuszczowych, stwierdzono 27% spadek ΔH_1 , 19% spadek ΔH_2 i 25% spadek ΔH_3 po 60-minutowej ekspozycji na promieniowanie. Największa procentowa zmiana dotyczyła więc przejścia pierwszego (licząc w kierunku wzrastającej temperatury). Łączna zmiana wynosząca około 200 kJ mol^{-1} nie różniła się od zmiany entalpii denaturacji wyznaczonej dla przejścia traktowanego całościowo. Zmniejszenie ΔH można wyjaśnić występowaniem agregacji białka pod wpływem promieniowania UV, którą sugerowały także wyniki badań spektroskopowych. Przyczyny zmniejszenia wartości entalpii denaturacji można również szukać w obniżeniu trwałości białka, np. w wyniku osłabienia wiązań wewnątrzcząsteczkowych.

Zastosowanie modelu dwustanowego z $\Delta C_p \neq 0$ pozwoliło na wyciągnięcie podobnych wniosków odnośnie do parametrów T_i oraz ΔH_i jak tych uzyskanych z modelu zakładającego $\Delta C_p = 0$. Dodatkowo płynące z niego informacje dotyczą zmian pojemności cieplnej w poszczególnych przejściach składowych (ΔC_{pi}) oraz tendencji zmian tych wielkości pod wpływem promieniowania. Znacząca różnica pomiędzy pojemnością cieplną białka w stanach: pofałdowanym i rozfałdowanym jest bardzo ważna dla określenia temperaturowej zależności konformacyjnej stabilności białka. Wiadomo, że odsłanianiu grup polarnych i niepolarnych przy rozfałdowaniu towarzyszy zmiana pojemności cieplnej o przeciwnych znakach. Jej dodatnie zmiany przypisywane są grupom hydrofobowym białka, a ujemne grupom polarnym (DILL, 1990; MURPHY *et al.*, 1990, 1991; LOLADZE *et al.*, 2001).

Zależność parametrów dopasowania krzywych DSC albumin HSA i HSAf w ramach modelu dwustanowego ($\Delta C_p \neq 0$) z trzema przejściami od czasu ekspozycji na promieniowanie UVC zilustrowano na rys. 26 A i B. Dla obydwu rodzajów albuminy ludzkiej obserwowana dodatnia wartość ΔC_{p1} lekko maleje z wydłużaniem czasu napromieniowania, natomiast wartość ΔC_{p3} jest ujemna i co do wartości bezwzględnej większa dla HSA niż dla HSAf (istotność różnic



Rys. 26. Parametry termodynamiczne (\pm błąd standardowy średniej) otrzymane w modelu dwustanowym ($\Delta C_p \neq 0$) z trzema przejściami dla HSA (A) i HSAf (B); (zestaw słupków od lewej do prawej dla czasów ekspozycji: 0, 30, 60 min odpowiada kolejno parametrom: T_1, T_2, T_3 (w $^\circ\text{C}$), $\Delta H_1, \Delta H_2, \Delta H_3$ (w 10 kJ mol^{-1}), $\Delta C_{p1}, \Delta C_{p2}, \Delta C_{p3}$ (w $\text{kJ mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$) (MICHNIK *et al.*, 2008)

potwierdziła analiza statystyczna). Wartość ΔC_{p2} jest bliska zeru, z wyjątkiem tej dla 30-minutowej ekspozycji — w tym przypadku przyjmuje ona znak dodatni dla HSA i ujemny dla HSAf. Warto zwrócić uwagę, że po 30-minutowej ekspozycji wszystkie trzy wartości ΔC_{pi} znacząco różnią się pomiędzy obydwoma albuminami, a kierunek zmian ΔC_{p2} i ΔC_{p3} w stosunku do warunków bez napromieniowania jest przeciwny. Fakty te wskazują na odmienną reakcję albuminy odtłuszczonej i zawierającej kwasy tłuszczowe na promieniowanie UVC.

Zmiany pojemności cieplnej w roztworach białka mogą być także wynikiem zdarzeń, w których następuje zamknięcie („zagrzebanie”) molekuł wody we wnętrzu makromolekuły. C.J. MORTON, J.E. LADBURY (1996) oszacowali wartość ΔC_p „zagrzebania” molekuł wody na zawierającą się w przedziale od -50 do $-25 \text{ JK}^{-1} (\text{mol wody})^{-1}$. Przedstawione różnice w parametrach ΔC_{pi} , świadczące o zróżnicowanej odpowiedzi obydwu albumin na promieniowanie, mogą być zatem związane również ze specyficzną reorganizacją wody w zmodyfikowanych promieniowaniem strukturach odpowiednich fragmentów cząsteczki albuminy.

Podsumowując zaprezentowane wyniki badań (MICHNIK, MICHALIK, 2004; MICHNIK *et al.*, 2008), promieniowanie UV jest czynnikiem, który bardzo wyraźnie zmienia prawidłową strukturę wszystkich badanych odmian albuminy w wyniku modyfikacji konformacji białka oraz powodowanie jego agregacji. Istotne wydaje się spostrzeżenie, że zmiany zachodzące w wodnych roztworach albuminy pod wpływem promieniowania UV przebiegają w podobnym kierunku jak te związane z upływem czasu, ale promieniowanie UV poza przyspieszeniem przemian czasowych powoduje prawdopodobnie dodatkowe zmiany strukturalne.

Z badań DSC oraz spektroskopowych wynika, że albumina pozbawiona kwasów tłuszczowych jest bardziej wrażliwa na działanie zarówno promieniowania UV w pełnym zakresie A—C, jak i promieniowania UVC o długości fali 254 nm. Naturalnie przyłączone do albuminy kwasy tłuszczowe pełnią zatem ochronną funkcję i powstrzymują zjawisko agregacji białka.

Szczegółowe wyniki analizy dekonwolucyjnej wskazują na różnice w konformacyjnym przeorganizowaniu cząsteczki albuminy odtłuszczonej i nieodtłuszczonej, powodowanym promieniowaniem UV. Bardziej narażony na to promieniowanie jest prawdopodobnie C-końcowy fragment makromolekuły albuminy. Atak na domenę I, czyli na N-końcową część rozfałdowującą się w roztworach wodnych w wyższej temperaturze, jest przypuszczalnie słabszy, przynajmniej w początkowej fazie działania promieniowania.

Podsumowanie

Śledzenie procesu rozkładania białka, czyli przejścia ze stanu natywnego w zdenaturowany, dostarcza ważnych informacji na temat trwałości struktury białka, oddziaływań istotnych dla jej stabilizacji, a także czynników powodujących zmiany konformacyjne. Obecnie na temat termodynamiki fałdowania / rozkładania białek globularnych dostępna jest obszerna literatura. Różnicowa mikrokalorymetria skaningowa, umożliwiająca bezpośrednie wyznaczenie cząstkowych pojemności cieplnych białek w roztworach wodnych należy do najlepszych metod służących poznaniu tego procesu. Wybór metody DSC znajduje swe uzasadnienie w unikalnej możliwości bezpośredniego wyznaczenia zmian entalpii rozważanego procesu, a następnie przez zależności termodynamiczne zmian entropii i energii swobodnej Gibbsa.

W opracowaniu teorii łączącej informacje termodynamiczne uzyskane z pomiarów kalorymetrycznych ze strukturą białka wprowadzono narzędzie do poznania konformacyjnej stabilności białek. Powiązanie takie dostrzegli w 1978 roku E. Freire R.L. Biltonen, tworząc podstawy analizy dekonwolucyjnej funkcji nadmiarowej pojemności cieplnej. Opiera się ono na formalnym związku sumy statystycznej i funkcji nadmiarowej pojemności cieplnej przy stałym ciśnieniu, a także funkcji nadmiarowej entalpii. Te mierzone doświadczalnie wielkości termodynamiczne zawierają zatem informację na temat stanów cząsteczki występujących w rozważanym zakresie temperatur.

Termiczna denaturacja albuminy, białka składającego się z trzech domen, jest procesem złożonym, którego przebieg odzwierciedlony w obrazie DSC zależy od rodzaju albuminy (ludzka, wołowa), formy (zawierająca kwasy tłuszczowe, odtłuszczona) oraz modyfikacji składu i właściwości rozpuszczalnika (woda, wodne roztwory etanolu), jego siły jonowej, pH, stężenia białka i warunków prowadzenia eksperymentu. Zaprezentowane wyniki badań pokazują, że w procesie tym uwidaczniają się również zmiany, które zaszły w badanych roz-

tworach białka z wpływem czasu oraz pod wpływem zewnętrznych czynników środowiskowych, np. promieniowania elektromagnetycznego. Na temat wielu z wymienionych zależności były już wcześniejsze doniesienia literaturowe, ale zostały one w bieżącej pracy uzupełnione (np. zbadanie zależności od pH dla nieodtłuszczonej formy albuminy wołowej), poszerzone o dodatkowe aspekty i przedyskutowane na tle danych literaturowych. W odróżnieniu od innych prac, w tym opracowaniu, prawie wszystkie badania prowadzono równolegle dla pochodzących z tego samego preparatu wyjściowego, nieodtłuszczonej oraz pozbawionej kwasów tłuszczowych form albumin, w tych samych warunkach doświadczalnych, w środowisku wodnym.

Specyfika termicznego rozfałdowania albuminy, które nie jest prostym przejściem dwustanowym, wymagała dobrania zestawu modeli matematycznych, opisujących poprawnie ten proces dla różnych odmian białka i pozwalających analizować zmiany wywoływane w jego przebiegu określonymi czynnikami fizykochemicznymi.

Wykazując możliwość rozważania procesu termicznego rozfałdowania albuminy w ramach termodynamiki równowagowej, przeprowadzono analizę dekonwolucyjną funkcji nadmiarowej pojemności cieplnej badanych form albumin. Z zastosowaniem odpowiednich modeli udało się uzyskać oryginalne wyniki, z których na podkreślenie zasługują:

- Udokumentowanie różnic w przebiegu procesu termicznego rozfałdowania albumin zawierających kwasy tłuszczowe i odtłuszczonej.
- Wykazanie silniejszego wiązania etanolu do albuminy odtłuszczonej w porównaniu z formą nieodtłuszczoną.
- Potwierdzenie możliwości wiązania etanolu do miejsc zajmowanych w cząsteczce albuminy przez krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe w subdomenie IIA.
- Spostrzeżenie o podziale makromolekuły albuminy na zależne od pH roztworu podjednostki ujawniające się w trakcie jej termicznej denaturacji.
- Wykazanie odmienności reakcji albumin odtłuszczonej i nieodtłuszczonej na promieniowanie UV przez stwierdzenie różnic w ich konformacyjnym przeorganizowaniu pod wpływem tego promieniowania.
- Wskazanie podjednostek cząsteczki białka reagujących w pierwszej kolejności na promieniowanie UV i RF.

Z przeprowadzonych obserwacji i analiz nie można jednoznacznie stwierdzić, czy wyodrębnione w procesie termicznego rozfałdowania albuminy strukturalne podjednostki odpowiadają jej strukturze domenowej. Wydaje się to jednak wysoce prawdopodobne w przypadku albumin ludzkich i nieodtłuszczonej albuminy wołowej, gdy rozpatrywany proces przebiega w roztworach wodnych o wartościach pH z zakresu odpowiadającego formie N albuminy. W takich warunkach rozfałdowanie odtłuszczonej formy albuminy wołowej odbywa się z podziałem na dwie, a nie na trzy podjednostki.

Do interesujących wyników prezentowanych w tym opracowaniu należy wykrycie subtelných efektów nietermicznych działania promieniowania o częstotliwości radiowej na wodne roztwory albuminy. Istnienie biologicznych efektów powstałych na skutek „atermicznej” ekspozycji na pola elektromagnetyczne jest nadal kontrowersyjne. Wykorzystanie wyspecjalizowanego, wysokoczułego mikrokalorymetru dowiodło, że nawet słabe bodźce, zmieniające w niewielkim stopniu konformację białka mogą być wykryte z zastosowaniem techniki DSC. Zaobserwowano, że promieniowanie RF o częstotliwości z zakresu od kilku do kilkudziesięciu MHz wywołuje wyraźny wpływ na termiczne przemiany zachodzące w roztworach wodnych albuminy, choć skutek ekspozycji na promieniowanie nie jest natychmiastowy, lecz ujawnia się w czasie. Zaskakująco słaby okazał się w porównaniu ze wskazanym zakresem efekt wywierany przez promieniowanie o największej z badanych częstotliwości, 247 MHz. Interesujące byłoby w związku z tym przeprowadzenie badań z zastosowaniem źródeł promieniowania o innych częstotliwościach, rzędu kilkuset MHz. Warto byłoby także wykonać badania zmian zachodzących w roztworach albuminy metodą DLS (Dynamycznego Rozpraszania Światła).

Inne ważne wyniki zawarte w pracy to udokumentowanie stabilizującego działania małych, a destabilizującego dużych stężeń etanolu na strukturę albuminy, wykazanie odmiennego charakteru wiązania etanolu do albuminy przy jego niskim i wysokim stężeniu oraz istnienia miejsc wiążących o zróżnicowanym powinowactwie do etanolu, z oszacowaniem minimalnych wartości parametrów charakteryzujących kompleksy albuminy z etanolem.

Istotnym wnioskiem wynikającym z całości zaprezentowanego materiału jest stwierdzenie, że naturalnie przyłączone do makromolekuły albuminy kwasy tłuszczowe pełnią ochronną funkcję, zapewniając jej większą trwałość termiczną oraz powstrzymując skutki destrukcyjnego wpływu pewnych czynników, np. promieniowania UV przez spowolnienie ogólnie zintensyfikowanego działaniem promieniowania zjawiska agregacji białka.

Zastosowana metoda badawcza nie pozwala na zidentyfikowanie zajętych przez kwasy tłuszczowe miejsc wiążących. Jednakże na bazie otrzymanych wyników można wnioskować, że w badanej formie albuminy nieodtłuszczonej zajęte było miejsce w subdomenie IIA. Najistotniejsze różnice pomiędzy odtłuszczonej i nieodtłuszczonej formą albuminy w roztworach etanolu udokumentowano bowiem dla subdomeny II. Informacja, że miejsce wiążące w subdomenie IIA jest jednym spośród dwóch (trzech) miejsc zajmowanych przez kwasy tłuszczowe w warunkach fizjologicznych, jest ważna z medycznego punktu widzenia, ponieważ jest to jedno z dwóch głównych miejsc wiązania leków.

Przedyskutowanie zagadnień związanych z procesem termicznego rozkładu białka osocza, albuminy, pozwoliło na zilustrowanie różnorodności i specyfiki problemów rozwiązywanych na podstawie analizy procesów przebie-

gających w roztworach białek pod wpływem kontrolowanego wzrostu temperatury. Pokazano, że zastosowanie odpowiednich narzędzi, np. w postaci właściwie dobranych modeli teoretycznych, pozwala uzyskać z kalorymetrycznych pomiarów wielkości makroskopowych informacje na poziomie molekularnym.

Dodatek

D I. Wiązanie kwasów tłuszczowych do albuminy

Albumina odpowiada za transport kwasów tłuszczowych, będących ważnym źródłem budulcowym i energetycznym dla ludzkiego organizmu. Wewnątrz organizmu są one dostarczane do komórek w formie kompleksów z albuminą. W warunkach fizjologicznych HSA niesie około 0,1—2 moli kwasów tłuszczowych na mol białka (SHRAKE *et al.*, 1984). W wyniku dyslipidemii typowej dla niektórych chorób sercowo-naczyniowych, jak cukrzyca czy preeklampsja, liczba molekuł kwasów tłuszczowych związanych z albuminą wzrasta.

Badania nad wiązaniem kwasów tłuszczowych do albuminy surowicy trwają od około 50 lat. Prowadzono je różnymi metodami, z których większość powodowała pewne modyfikacje białka, a to komplikowało interpretację wyników. Ujawnienie znaczącego oddziaływania pomiędzy miejscami wiążącymi kwasy tłuszczowe i leki jest ważne z medycznego punktu widzenia. Obserwacje dotyczące istnienia wielokrotnych miejsc wiążących o różnym powinowactwie mają związek z farmakokinetyką leków (GHUMAN *et al.*, 2005).

Analiza rentgenowska kompleksów HSA z kwasami tłuszczowymi wykazała asymetryczne rozmieszczenie miejsc wiążących dla kwasów tłuszczowych (rys. 1B). Zaproponowano istnienie dwóch lub trzech miejsc o wysokim powinowactwie i przynajmniej trzech miejsc o niskim powinowactwie (CARTER, HO, 1994; PETERS, 1995). S. CURRY *et al.* (1998) jako pierwsi podali strukturę krytalograficzną albuminy ludzkiej skompleksowanej z pięcioma molekułami kwasu tetradekanowego (mirystynianowego) (C14:0).

Wiązanie kwasów tłuszczowych do albuminy powoduje zmiany konformacyjne (CARTER, HO 1994; CURRY *et al.*, 1998, 1999; PETIPTAS *et al.*, 2001) polegające na rotacji domen I i III względem centralnej domeny II, przy czym każda

z domen zachowuje swą konformację, poza dwoma helisami C-końca, które przesuwają się na zewnątrz molekuly (SUGIO *et al.*, 1999). Następuje poszerzenie molekuly białka (rys. 1A,B). Stwierdzono, że zmiany konformacyjne indukowane przez kwasy tłuszczowe w HSA są odwracalne (CARTER, HO, 1994).

Kolejne badania krystalograficzne (BHATTACHARYA *et al.*, 2000) pozwoliły na rozróżnienie miejsc wiążących dla długo-, średnio- i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Scharakteryzowano dokładnie 9 miejsc wiążących. Wyodrębniono wspólny zestaw 7 miejsc wiążących dla kwasów tłuszczowych zawierających w łańcuchu od 10 do 18 atomów węgla. Różnią się one geometrią kieszeni dla kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha. W 5 pierwszych miejscach reszty metylenowe lokują się w hydrofobowych wnękach i rozciągają się w nich niezależnie od tego, czy kieszeń jest krótka i szeroka (jak w miejscach 1. i 3.), czy długa i wąska (jak w miejscach 2., 4. i 5.). Charakter miejsc 6. i 7. trudniej jednoznacznie określić, jednakże stwierdzono, że są to miejsca o mniejszym powinowactwie, bo związane kwasy C14:0 mogą być z nich wyparte przez konkurencyjnie wiązane leki. Jednocześnie sugeruje się, że miejsce 7. w subdomenie IIA może być pierwotnym miejscem wiązania dla krótszych kwasów tłuszczowych. Spośród miejsc wiążących długołańcuchowe kwasy tłuszczowe to o największym powinowactwie ułożone jest prawdopodobnie w subdomenie IIIB. Dla kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha (C10:0—C14:0) zidentyfikowano 4 miejsca (preferencyjne — w subdomenach IIA i IIIA), a dla najkrótszych z badanych (C10:0) — 2 miejsca (obydwa w dużej szczelinie między domenami I i III). Ważne miejsce wiążące, choć o słabszym powinowactwie, znajduje się w centrum domeny I (BHATTACHARYA *et al.*, 2000; CURRY *et al.*, 1999), blisko aktywnego miejsca wiążącego dla miedzi, w sąsiedztwie cysteiny Cys-34 (GRYZUNOV *et al.*, 2003).

Obserwacje poczynione w badaniach strukturalnych są w zgodzie z wcześniejszymi danymi NMR (PISTOLA *et al.*, 1987) wskazującymi, że miejsca wiążące bez znaczącego wkładu oddziaływań elektrostatycznych między białkiem i kwasami tłuszczowymi charakteryzują się niższym powinowactwem i są okupowane tylko przy wysokim stosunku molowym kwasów tłuszczowych do białka.

Interesującym zagadnieniem jest jednoczesne wiązanie kwasów tłuszczowych i innych ligandów do makromolekuly albuminy. Stwierdzono, że struktura krystaliczna potrójnego kompleksu HSA-mirystynian-hemina ujawnia konformację pośrednią między odtuszczoną i skompleksowaną z kwasami tłuszczowymi formą albuminy. Hemina wiązana jest w hydrofobowej wnęce subdomeny I B, zajmowanej zwykle przez kwasy tłuszczowe (ZUNSZAIN *et al.*, 2003 b). Pokazano, że wiązanie kwasów tłuszczowych ułatwia utlenianie grup SH Cys-34 i przekształca kompleksy albuminy z miedzią z antyoksydantów w prooksydanty (GRYZUNOV *et al.*, 2003). Wykazano, że siła wiązania genisteiny, związku z grupy izoflawonoidów, jest taka sama dla HSA i BSA, ale niższa dla albumi-

ny ludzkiej wolnej od kwasów tłuszczowych, co świadczy o tym, że związane kwasy tłuszczowe wzmacniają powinowactwo genisteiny do HSA (MAHESHA *et al.*, 2006). Obecność kwasów tłuszczowych zatem zmienia zarówno strukturę, jak i własności funkcjonalne albuminy.

D II. Siły stabilizujące strukturę białka

Aby białko mogło pełnić przeznaczone mu funkcje, musi być utrzymywane w charakterystycznym dla niego stanie natywnym. Od wielu lat prowadzi się badania mające na celu wyjaśnienie roli różnych typów oddziaływań w tworzeniu i utrzymywaniu zwiniętej, zwartej struktury białka. Konformacja łańcucha peptydowego zależy od jego sekwencji aminokwasowej. Kowalencyjne wiązania peptydowe oraz kowalencyjne mostki dwusiarczkowe budują „szkielet” białka. Kształtowanie ostatecznej jego struktury uwarunkowane jest natomiast współgraniem silnych oddziaływań kowalencyjnych i słabych oddziaływań niekowalencyjnych. Zagadnienia dotyczące tej tematyki są szeroko omawiane i dyskutowane (FINKELSTEIN, PTITSYN, 2002; JACKSON, 2006; PACE *et al.*, 1996; ZIELENKIEWICZ, 2003 b). Duży wysiłek i zaangażowanie wielu badaczy ukierunkowane są na problem rozdzielenia energetycznych wkładów poszczególnych rodzajów sił stabilizujących natywny stan białka. Badania skupiają się wokół zagadnień związanych ze względnym udziałem wiązań wodorowych, mostków solnych (oddziaływań między przeciwnie naładowanymi grupami łańcuchów bocznych), oddziaływań hydrofobowych. Stale poszukiwana jest odpowiedź na pytanie, czy istnieją ogólne zasady kierujące procesem fałdowania się białek, czy proces ten jest indywidualny dla danego białka.

Jedne z pierwszych prac dotyczyły prób oceny udziału oddziaływań elektrostatycznych. Zjawisko kwasowej denaturacji białek, w której energia swobodna oddziaływań elektrostatycznych jest modyfikowana przez zmniejszenie pH, wyraźnie wskazuje, że jonizowalne grupy mogą dawać istotny wkład w stabilizację struktury białek. Stwierdzono jednakże, że oddziaływania pomiędzy parami jonów na powierzchni białka odgrywają drugorzędą rolę w stabilizacji stanu natywnego białka (DILL, 1990; YANG, HONG, 1993). Jednocześnie wiele danych eksperymentalnych wskazuje na istotność resztowych oddziaływań pomiędzy ładunkami w stanie zdenaturowanym (WHITTEN, GARCIA-MORENO, 2000), a optymalizacja oddziaływań między ładunkami na powierzchni białek wydaje się użyteczną strategią w uzyskiwaniu termostabilnych enzymów (SANCHEZ-RUIZ, MAKHATADZE, 2001).

Badania ukierunkowanej mutagenety białek dostarczyły wielu informacji na temat udziału specyficznych reszt aminokwasowych w stabilizacji struktury

białka. Na przykład białka mające zagłębienia w rdzeniu hydrofobowym można stabilizować przez zastąpienie dużych, niepolarnych reszt aminokwasowych małymi, niepolarnymi aminokwasami (np. zastąpienie leucyny waliną). Natomiast destabilizację białka osiąga się przez usunięcie mostków dwusiarczkowych, wprowadzenie dużych, niepolarnych aminokwasów, które nie mogą zmieścić się w rdzeniu hydrofobowym lub zastąpienie polarnych reszt aminokwasowych — tworzących korzystne dla stabilności białka wiązania wodorowe lub mostki solne — resztami nietworzącymi takich połączeń.

Większość z przeprowadzonych badań wskazuje, że najważniejsze siły rządzące strukturą i oddziaływaniami molekuł biologicznych są związane z efektem hydrofobowym. Jego wkład do termicznej stabilności białek jest rzędu setek kJ mol^{-1} . W celu zrozumienia fizycznych podstaw tego efektu od wielu lat prowadzi się badania oddziaływań pomiędzy substancją rozpuszczoną i rozpuszczalnikiem dla serii związków organicznych uporządkowanych ze względu na ich hydrofobowość (PIEKARSKI, TKACZYK, 1995; TANIEWSKA-OSIŃSKA, PIEKARSKI, 1984, 1994; SPOLAR *et al.*, 1992; ZIELENKIEWICZ, POZNAŃSKI, 1998, 1999; ZIELENKIEWICZ, 2003).

Pośród wielkości termodynamicznych charakteryzujących hydrofobową naturę związku, jedną z najdokładniej określonych jest cząstkowa molowa objętość V_2^0 wyznaczona z pomiarów gęstości. Są też precyzyjne dane dotyczące tej wielkości dla grup związków organicznych (alkenów, amin, amidów, alkoholi, aminokwasów i peptydów), które traktuje się jako modelowe dla białek i kwasów nukleinowych. Korzystając ze znanych wartości V_2^0 zaproponowano nowy, dogodny parametr do porównywania związków o różnej strukturze i polarności (ZIELENKIEWICZ, POZNAŃSKI, 1998 a, b), a mianowicie względną gęstość powłoki solwatacyjnej, α , zdefiniowaną jako stosunek różnicy $V_2^M - V_2^0$ do $V_{1,\text{solv}}$ (V_2^M — objętość molekularna, $V_{1,\text{solv}}$ — objętość powłoki solwatacyjnej). Wyliczając objętość powłoki solwatacyjnej (jako równą objętości wyznaczonej przez przetoczenie sfery o średnicy jednej molekuly rozpuszczalnika po powierzchni substancji rozpuszczonej) i szacując wartości V_2^M półempirycznie, stosując metody mechaniki molekularnej, wyznaczono wartości α dla wody i wodnych roztworów wielu wspomnianych grup związków organicznych. Stwierdzono, że wartości α silnie zależą od liczby grup CH_2 , jest też liniowa dodatnia korelacja pomiędzy α i polarnością (zdefiniowaną jako stosunek powierzchni molekularnej polarnych grup i atomów eksponowanych na rozpuszczalnik do całkowitej powierzchni molekularnej) w danych seriach związków. Wartości α maleją ze wzrostem hydrofobowości związku rozpuszczonego. Są ujemne, co oznacza, że średnia gęstość wody w powłoce hydratacyjnej jest mniejsza niż dla czystej wody (koncepcja „góry lodowej”). Zależą one silnie od struktury molekuly — różnią się dla związków liniowych i cyklicznych o tej samej liczbie grup CH_2 i NH (ZIELENKIEWICZ, POZNAŃSKI, 1998 a, b).

Wzrost hydrofobowości rozpuszczalnika sprzyja destabilizacji białka i jego denaturacji. Nasilenie denaturującego działania alkoholi, alkilomoczników, alkiloamidów ze wzrostem długości ich łańcucha alkilowego odzwierciedla ich zdolność do współzawodnictwa w hydrofobowych kontaktach pomiędzy resztami aminokwasowymi we wnętrzu białka (LUBAS *et al.*, 1979; MICHNIK, LUBAS, 1986; HERSKOVITZ *et al.*, 1970 a—c).

Oddziaływania hydrofobowe są zależne od temperatury (SCHELLMAN, 1997). Słabną wraz z jej obniżaniem aż do momentu, gdy przestają być na tyle silne, by stabilizować stan natywny białka. W niskich temperaturach (zwykle poniżej 0°C) obecność hydrofobowych powierzchni wnosi stosunkowo małą różnicę ze względu na istniejące w wodzie wystarczające uporządkowanie. Osłabienie oddziaływań hydrofobowych powoduje denaturację białka, zatem, zarówno niska, jak i wysoka temperatura mogą denaturować białko (GRIKO, PRIVALOV, 1992; NEIRA, GOMEZ, 2004). Efekt hydrofobowego wkładu do energii swobodnej Gibbsa rozfałdowania białka w temperaturze 25°C szacuje się na około 8 kJ mol⁻¹ na resztę aminokwasową (ROBERTSON, MURPHY, 1997; MAKHATADZE, PRIVALOV, 1995).

Choć oddziaływania hydrofobowe są tymi, które odgrywają pierwszoplanową rolę w procesie zwijania się łańcucha polipeptydowego, a rola wiązań wodorowych, tworzonych dopiero po zaistnieniu asocjacji grup niepolarnych, jest prawdopodobnie wtórna, mają one olbrzymie znaczenie w stabilizacji specyficznej konformacji białka. Prawie 90% wszystkich grup w białku, które mogą tworzyć wiązania wodorowe, tworzą je pomiędzy sobą lub z molekułami ośrodką. Średnie czasy życia takich wiązań są prawdopodobnie rzędu 10⁻¹² s (HUANG, 2005). Średnia długość wiązań wodorowych obserwowanych w białkach wynosi 3,04 Å (STICKLE *et al.*, 1992). Najliczniejszą grupę wiązań wodorowych (68,1%) tworzą wiązania typu <C=O...H—N>, następnymi pod względem liczebności są wiązania: >C=O...łańcuch boczny (10,9%), >N—H...łańcuch boczny (10,4%), łańcuch boczny...łańcuch boczny (10,6%) (STICKLE *et al.*, 1992).

Eksperymenty dotyczące stabilności zmutowanych białek sugerują, że wiązania wodorowe wnoszą coś więcej ponad stabilizację zainicjowanych poprzez kontakty hydrofobowe struktur (MYERS, PACE, 1996). Białka są faktycznie destabilizowane przez mutacje reszt tworzących wiązania wodorowe. Chociaż dowolna mutacja ma wielorakie efekty energetyczne, po uważnym oszacowaniu różnych wkładów stwierdzono, że usunięcie wiązania wodorowego destabilizowało stan natywny, powodując zmianę jego energii swobodnej aż o 4RT. Średni efekt stabilizujący jednego wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego oceniono na 1 do 2 kcal mol⁻¹.

Interesujące podejście do roli wiązań wodorowych rozwinięto, używając wymiany wodorowo-deuterowej (SHI *et al.*, 2002). Deuter wchodzi selektywnie w słabsze wiązania wodorowe. Silniejsze wiązania wodorowe preferują protony. Stosunek deuter/wodór (mierzony techniką NMR) może być użyty do osza-

cowania energii poszczególnych wiązań wodorowych w białku. Co więcej, osłabienie wiązań wodorowych przez wymianę izotopową przesuwa równowagę pomiędzy stanem natywnym i zdenaturowanym. Te eksperymenty prowadzą do oszacowań $2,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ (około $1RT$) dla wkładu wiązania wodorowego w α -helisie do stabilności stanu zwiniętego. Efekt stabilizujący jest różny dla różnych białek i w białkach z mniejszą zawartością α -helisy i większą zawartością β -kartki, efekt stabilizujący wiązań wodorowych nie jest widoczny. Na energetykę wiązań wodorowych wpływa polarność środowiska. W wodzie wiązanie wodorowe jest procesem wymiany, w którym kontakty z wodą są zastąpione przez kontakty wewnątrzcząsteczkowe; zmiana energii swobodnej związana z wymianą wiązania wodorowego jest mała. Kiedy wiązanie wodorowe tworzy się pomiędzy dwoma grupami w białkowym wnętrzu, woda zostaje wykluczona. Wiązanie wodorowe nie jest wtedy procesem wymiany, a cała energia wiązania jest dostępna dla kierowania tworzeniem struktury drugorzędowej.

D III. Wpływ środowiska na konformacyjną stabilność makromolekuły białka

Środowisko makromolekuły może być modyfikowane różnymi czynnikami, wpływającymi na równowagę sił decydujących o przyjmowanych przez białko konformacjach.

Woda. Aktywność białka oraz jego konformacyjna elastyczność są w dużym stopniu uwarunkowane jej obecnością. Hydratacja wpływa na trójwymiarową strukturę białka. G.I. Makhatadze i P.L. Privalov przeanalizowali jej znaczenie w procesie fałdowania się białka, wyliczając entalpię, entropię i energię Gibbsa hydratacji polarnych i niepolarnych grup przy rozfałdowaniu kilku białek globularnych w zakresie temperatur od 5°C do 125°C (MAKHATADZE, PRIVALOV I, II, 1993). Wykazali oni, że entalpia hydratacji polarnych grup znacznie przewyższa entalpię hydratacji grup niepolarnych. Przy niskich temperaturach obydwie entalpie są ujemne i zmieniają się w przeciwnych kierunkach ze wzrostem temperatury. Entalpia przeniesienia niepolarnych grup z wnętrza białka do wody jest ujemna poniżej temperatury 25°C i dodatnia powyżej tej temperatury. Entalpia przeniesienia polarnych grup z wnętrza białka do wody jest dodatnia w niskich temperaturach i staje się ujemna w wysokich temperaturach. W rozważanym zakresie temperatur entalpia przeniesienia niepolarnych grup dominuje. Skutkiem tego jest dodatnia entalpia rozfałdowania białka wraz ze wzrostem temperatury. Entropia hydratacji jest ujemna zarówno dla polarnych, jak i niepolarnych grup, ale podobnie jak entalpia zmienia się w przeciw-

nych kierunkach ze wzrostem temperatury. Co do wartości bezwzględnej entropia hydratacji grup polarnych wzrasta, a niepolarnych maleje, stając się zerem w 122°C dla grup alifatycznych i w 104°C dla grup aromatycznych, a następnie zmienia znak w wyższych temperaturach. Hydratacja grup polarnych i aromatycznych niepolarnych destabilizuje natywną strukturę białka, podczas gdy hydratacja niepolarnych grup alifatycznych (hydratacja hydrofobowa) stabilizuje ją. Za zimną denaturację białka (mówimy o niej wtedy, gdy stan zdenaturowany występuje w niższej temperaturze niż stan natywny) jest głównie odpowiedzialna hydratacja grup polarnych (PRIVALOV, MAKHATADZE, 1993).

Wiedza na temat wkładu hydratacji w konformacyjną stabilność białek stale nie jest wyczerpująca. Brak np. jednoznacznej opinii na temat zawartości wody we wnękach hydrofobowych (MYERS, PACE, 1996).

Temperatura. Jej wzrost ma dezorganizujący wpływ na rozpuszczalnik i na makromolekułę, sprawia, że konformacje o większej całkowitej energii swobodnej stają się dostępne i ostatecznie wiedzie makromolekułę w kierunku bardziej rozfałdowanej formy przez zwiększenie „stresu termicznego” na słabe oddziaływania trzymające łańcuch lub łańcuchy polipeptydowe razem. Kiedy temperatura wzrasta, oddziaływania elektrostatyczne zmieniają się nieznacznie, wiązania wodorowe ulegają osłabieniu, a hydrofobowe wzmocnieniu (do temperatury około 110°C (WANG, 1999)).

Ciśnienie. Poddanie białka ciśnieniu hydrostatycznemu prowadzi do jego rozfałdowania. Fakt, że białka mogą być rozfałdowywane przez ciśnienie, wynika z ogólnej termodynamicznej zależności:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V^0}{RT} \quad (\text{DIII.1})$$

(K jest stałą równowagi reakcji rozfałdowania w standardowym stanie ⁰, ΔV^0 jest zmianą objętości). Wynika z niej, że w stałej temperaturze powinna następować w procesie rozfałdowania ogólna ujemna zmiana objętości. W ogromnej większości przypadków wyniki badań rzeczywiście wskazują na znaczące zmniejszenie się objętości przy rozfałdowaniu (FRYE, ROYER, 1998; ROYER, 2002). Są jednak także dane świadczące o tym, iż z powodu różnicy w rozszerzalności termicznej pofałdowanego i rozfałdowanego stanu białka znak zmiany objętościowej może stać się dodatni w wysokich temperaturach (ROYER, 2005). Eliptyczny kształt diagramu fazowego obserwowany dla roztworów białek sugeruje, że przy pewnych wartościach ciśnienia i temperatury zmiany objętości przy rozfałdowaniu mogą być dodatnie (SMELLER, 2002). Wpływ ciśnienia na strukturę białka zależy od zmian w objętości i ściśliwości, które towarzyszą białkowym przejściom konformacyjnym, w szczególności częściowemu lub

całkowitemu rozfałdowaniu. Zmiany w energii swobodnej rozfałdowania w odniesieniu do ciśnienia atmosferycznego p_0 są dane równaniem:

$$\Delta G_{u(p)} = \Delta G_{u(p_0)} + \int_{p_0}^p \Delta V_u dp, \quad (\text{DIII.2})$$

które może być rozwinięte w szereg Taylora

$$\Delta G_{u(p)} = \Delta G_{u(p_0)} + \Delta V_u^0 (p - p_0) + \frac{\Delta \beta_u}{2} (p - p_0)^2 + \dots, \quad (\text{DIII.3})$$

gdzie: $\Delta \beta = \partial \Delta V / \partial p$ jest ściśliwością izotermiczną. Nieliniowość wykresu $\ln K$ względem ciśnienia wskazuje, iż zmiana ściśliwości jest wkładem, który nie powinien być zanedbany.

Ponieważ zmiany objętości zależą nie tylko od ciśnienia, lecz także od temperatury, należy jeszcze uwzględnić czynnik związany z rozszerzalnością termiczną: $\Delta \alpha = \partial \Delta V / \partial T$. Zatem:

$$\Delta V = \Delta V^0 + \Delta \alpha (T - T_0) - \Delta \beta (p - p_0). \quad (\text{DIII.4})$$

Za ciśnieniowo-indukowane rozfałdowanie białka w dużej mierze odpowiedzialne są efekty solwatacyjne (ROYER, 2005). Pod wpływem wysokiego ciśnienia woda penetruje puste przestrzenie w białku, co destabilizuje wewnętrzne połączenia i ułatwia proces denaturacji. Jedną z ważniejszych przyczyn denaturacji ciśnieniowej jest prawdopodobnie osłabienie hydrofobowych oddziaływań między niepolarnymi łańcuchami bocznymi (BALNY *et al.*, 2002; HARANO, KINOSHITA, 2006), choć przeciwny pogląd, sugerujący stabilizację oddziaływań hydrofobowych przez podwyższone ciśnienie jest także spotykany w doniesieniach literaturowych (BOONYARATANAKORNKIT *et al.*, 2002). Ostatnie badania wskazują, że całokształt ścieżek rozfałdowania przy ciśnieniowej denaturacji jest inny niż przy denaturacji cieplnej lub chemicznej (HARANO, KINOSHITA, 2006).

Białka suche, w stanie stałym są bardzo odporne na ciśnieniową denaturację. Mały wzrost ciśnienia może zwiększać odporność białka zarówno na zimną, jak i na ciepłą denaturację. Pierwszo- i drugo-rzędowa struktura białek nie jest zmieniana nawet przez tak wysokie ciśnienia, jak 10 kbar, czyli 1000 MPa (BOONYARATANAKORNKIT *et al.*, 2002). Dysocjacja multimerycznych białek występuje zwykle przy ciśnieniach 100–200 MPa, a typowe ciśnienie powodujące rozfałdowanie białka to około 500 MPa (SMELLER, 2002).

pH. Zmiany w stężeniu jonów wodorowych mogą wpłynąć na specyficzne wiązanie protonów do ulegających jonizacji miejsc makromolekuły, jak również na naturę rozpuszczalnika przez zmianę względnych stężeń uwodnionych proto-

nów. Grupy funkcyjne (aminowe, karboksylowe itd.) biomolekuł dysocjują przy określonej wartości pH, a wiele ich właściwości biologicznych i fizycznych zależy od tej dysocjacji. Przy wartościach pH dalekich od pI danego białka pojawia się tendencja do rozfałdowania ze względu na wzrost odpychania elektrostatycznego pomiędzy podobnymi ładunkami w białku (DILL, 1990, WANG, 1999). Zmiana pH może zmieniać względną stabilność subdomen, co pociąga zmiany w kooperatywności procesu fałdowania (rozfałdowania).

Rozpuszczalniki niewodne, takie jak: alkohole, dioksan, dimetylosulfotlenek, glikol etylenowy, zmniejszają stałą dielektryczną ośrodka i wzmacniają wewnątrz- i międzycząsteczkowe oddziaływania elektrostatyczne. Dla zrozumienia wpływu tych rozpuszczalników na trwałość struktur białkowych pomocne są wyniki badań prowadzonych w celu wyjaśnienia natury wodnych roztworów tych substancji organicznych (PIEKARSKI, TKACZYK, 1995; TANIEWSKA-OSIŃSKA, PIEKARSKI, 1984, 1994).

W kontakcie z rozpuszczalnikiem znikają rdzenie hydrofobowe białka, a jego powłoka hydratacyjna może ulec zniszczeniu, prowadząc do destabilizacji i rozfałdowania białka. Niewodne rozpuszczalniki redukują energię swobodną stanu rozfałdowanego przez solwatację wyeksponowanych reszt niepolarnych (DILL, 1990).

Substancje współzawodniczące w tworzeniu wiązań wodorowych — jak mocznik, sole guanidyny, formamid; mogą znacząco zmienić trwałość konformacji makromolekularnych, w ogólności kierując je do formy rozfałdowanej. Przy niskich stężeniach tych denaturantów możliwy jest efekt stabilizacji i aktywacji białka (HUNG, CHANG, 1998; STANIFORTH *et al.*, 1998; MAYR, SCHMID, 1993). Ze względu na wiązanie molekuł związku denaturującego do białka na zasadzie licznych wiązań wodorowych znaczącym ograniczeniem podlega konformacyjna swoboda łańcucha polipeptydowego i wątpliwości budzi obecność konformacji kłęбка statystycznego w stężonych roztworach tych związków denaturujących (MAKHATADZE, PRIVALOV, 1992).

Substancje wpływające na oddziaływania hydrofobowe — takie jak węglowodory alifatyczne i aromatyczne, znacząco modyfikują siłę oddziaływań hydrofobowych i zmieniają strukturę rozpuszczalnika.

Sole obojętne — mogą reagować z biomolekułami na różne sposoby; zależnie od typu, stężenia soli, pH roztworu, mogą stabilizować, destabilizować lub nie mieć wpływu na trwałość białka (KOHN *et al.*, 1997). Są one używane do modyfikacji konformacyjnej stabilności i rozpuszczalności makromolekuł, a także w badaniach wytrącania i krystalizacji białek (GEORGALIZ *et al.*, 1997; WSZELAKA-RYLIK, ZIELENKIEWICZ, 2007; A. ZIELENKIEWICZ, 2005, 2007). Sole

zmieniają oddziaływania elektrostatyczne w białku na dwa sposoby: przez niespecyficzne ekranowanie elektrostatyczne (Debye'a—Hückla) i przez specyficzne wiązanie jonów do białka.

Stwierdzono, że NaCl podwyższa zarówno temperaturę jak i entalpię BSA, czyniąc strukturę białka bardziej zwartą dzięki zwiększonej sile jonowej, powodującej redukcję długozasięgowych elektrostatycznych oddziaływań odpychających pomiędzy ładunkami (GIANCOLA *et al.*, 1997). Zauważono także związek pomiędzy obecnością NaCl w roztworze a termiczną agregacją białka, np. Rnasy przy pH 3 (TSAI *et al.*, 1998).

Detergenty, w tym surfaktanty — są związkami powierzchniowo czynnymi, obniżają napięcie powierzchniowe wody. Wpływają na funkcjonalne właściwości białek. Przez oddziaływanie z białkami mogą modyfikować trwałość i charakterystyki układów zawierających białka (np.: żeli, pianek, emulsji). Ich wiązanie do białek może powodować zmiany w konformacji makromolekuł, może prowadzić zarówno do stabilizacji, jak i destabilizacji struktury białka zależnie od rodzaju związku, jego stężenia oraz warunków środowiskowych (DEEP, AHLUWALIA, 2001). Wyróżnia się surfaktanty niejonowe i jonowe. Niskie stężenia surfaktantów niejonowych redukują agregację oraz hamują chemiczną degradację białek. Jonowe surfaktanty mogą się wiązać zarówno do polarnych, jak i niepolarnych grup w białku i powodują denaturację. Sierczan dodecylosodowy (SDS), jeden z najpowszechniej badanych anionowych surfaktantów, powoduje rozfałdowanie większości białek, jeśli jego stężenie jest większe niż 2 mM (MOOSAVI-MOVAHEDI *et al.*, 1997; NAZARI *et al.*, 1997; DAYER *et al.*, 2002). W niskich stężeniach SDS zapobiega autooksydacji hemoglobiny (DAYER *et al.*, 2002), przy stosunku molowym SDS/BSA poniżej 10 wpływa on stabilizująco na albuminę surowicy wołowej (GIANCOLA *et al.*, 1997).

Jony metali. Zależnie od typu i stężenia mogą destabilizować lub stabilizować białko oraz zmieniać jego aktywność (COOPER *et al.*, 1997). Pewne białka są stabilne tylko w obecności szczególnych jonów metali. Nawet znacząca zmiana konformacyjnej stabilności białka, spowodowana wpływem jonów metali, może następować bez zmiany struktury drugorzędowej (WANG, 1999). Zdolność jonu wapnia Ca^{2+} , umożliwiająca jego równoczesne koordynowanie z wieloma ligandami (atomami tlenu) pozwala mu na sieciowanie różnych segmentów białka i indukowanie dużych zmian konformacyjnych. Związanie jonów Ca^{2+} do kilku miejsc wiążących kalmoduliny przekształca to białko z formy nieaktywnej w formę aktywną. Po zaktywowaniu kalmodulina wiąże się z wieloma enzymami i innymi docelowymi białkami w komórce, modyfikując ich działanie (Stryer, Biochemia). Jony metali przejściowych mogą katalizować utlenianie białek (CHENG *et al.*, 1991; WANG, 1999; GRYZUNOV *et al.*, 2003; STADLER *et al.*, 2004).

D IV. Pomiaru kalorymetryczne i spektrofotometryczne

Materiałem badawczym była surowicza albumina, min. 99% czystości, pozbawiona globulin (Sigma): BSA — wołowa, (Lot 79H7614, 023K7612), BSAf — odtłuszczona (Lot 89H7604), zawartość kwasów tłuszczowych poniżej 0,005%, HSA — ludzka (A8763, Lot 111K7612), HSAf — odtłuszczona (A3782, Lot 113K7601), zawartość kwasów tłuszczowych poniżej 0,005%.

Pomiary kalorymetryczne wykonano z zastosowaniem różnicowego mikrokalorymetru skaningowego VP DSC (MicroCal Co.), a spektroskopowe — z zastosowaniem spektrofotometru UV VIS Jasco V — 530.

Wszystkie badania przeprowadzono w roztworach wodnych. Kontrolowano wartość pH roztworów białek w trakcie eksperymentu. W tabeli D1 scharakteryzowano ogólne warunki doświadczalne w przeprowadzonych badaniach kalorymetrycznych roztworów albuminy, modyfikowanych wpływem wybranych czynników fizykochemicznych. Szczegóły dotyczące poszczególnych typów eksperymentów opisano w pracach (MICHNIK, 2003, 2007 a; MICHNIK *et al.*, 2004, 2005 a, 2007 b, 2008).

W celu zapewnienia dobrej powtarzalności pomiarów DSC, przed seriami pomiarów właściwych wykonywano kilkakrotny pomiar instrumentalnej linii bazowej (rozpuszczalnik — rozpuszczalnik), upewniając się, że jest on prawie idealnie powtarzalny.

Dane DSC analizowano przy użyciu oprogramowania MicroCal Origin, natomiast widma UV VIS — w ramach oprogramowania Spectra Analysis. Przed

Tabela D1
Warunki doświadczalne w kalorymetrycznych badaniach przemian konformacyjnych białek, modyfikowanych wpływem wybranych czynników fizykochemicznych

Rodzaj badania	Białko	Stężenie białka / mM ($\pm 0,002$ mM)	pH roztworu	Szybkość skanowania / $^{\circ}\text{C min}^{-1}$
Podstawowe	BSA	0,029—0,075	$5,5 \pm 0,3$	0,7—1,5
	BSAf	0,029—0,075	$5,5 \pm 0,3$	0,7—1,5
	HSA	0,015—0,15	$6,0 \pm 0,5$	0,7—1,5
	HSAf	0,015—0,075	$6,0 \pm 0,5$	0,7—1,5
Wpływ pH	BSA	0,022 i 0,044	3,0—7,0	0,7—1,5
Wpływ etanolu	HSA	0,022 i 0,045	$6,0 \pm 0,5$	1,0
	HSAf	0,022 i 0,045	$6,0 \pm 0,5$	1,0
Wpływ promieniowania o częstotściach radiowych	BSA	0,044	$5,5 \pm 0,3$	1,0
Wpływ promieniowania UV	BSA	0,044	$5,5 \pm 0,3$	1,0
	BSAf	0,044	$5,5 \pm 0,3$	1,0
	HSA	0,022	$6,0 \pm 0,5$	1,0
	HSAf	0,022	$6,0 \pm 0,5$	1,0

dokonaniem normalizacji stężeniowej przeprowadzono spektrofotometryczną korekcję stężeń białka w roztworze. Przy opracowywaniu krzywych DSC stosowano sigmoidalną linię bazową, z wyjątkiem przypadku BSAf (MICHNIK, 2003), gdzie wybrano linię bazową typu liniowego.

D V. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie STATISTICA 7.0.

Przed wyborem odpowiedniej procedury statystycznej dla zweryfikowania postawionych hipotez, w celu sprawdzenia normalności rozkładów, stosowano test Schapiro—Wilka, a żeby potwierdzić jednorodność wariancji — test Levene’a. Przy porównaniach średnich wartości parametrów wyznaczonych doświadczalnie, a także w ramach stosowanych modeli teoretycznych oraz badając wpływ wybranych czynników fizykochemicznych na te parametry, wykorzystano analizę wariancji (ANOVA/MANOVA) lub testy nieparametryczne: Kruskala Wallisa w przypadku zmiennych niepowiązanych i test Friedmana, gdy zmienne należało traktować jako powiązane. Jeśli analiza wariancji wskazała na istotność różnic, stosowano testy *post hoc*: zwykle był to test Scheffego lub RIR Tukeya. W niektórych przypadkach porównywano średnie tylko w dwóch grupach i wtedy użyto testu Manna—Whitneya lub Wilcoxona, zależnie od typu zmiennych.

Literatura

- AGNIR, 2003: Health effects from radiofrequency electromagnetic fields. Report of an Advisory Group on Nonionising Radiation. Doc NRPB, **14 (29)**: 1—177.
- AMIRE O.A., MASOUDY J., SABOURY A.A., MOOSAVI-MOVAHEDI A.A., 1997: Enthalpy change of the alleosteric transition in human haemoglobin A. *Thermochim. Acta*, **303**: 219—224.
- ANRAKU M., KOUNO Y., KAI T., TSURUSAKI Y., YAMASAKI K., OTAGIRI M., 2007: The role of N-acetyl-methioninate as a new stabilizer for albumin products. *Int. J. Pharm.*, **329**: 19—24.
- ARAKAWA T., KITA Y., 2000: Stabilizing effects of caprylate and acetyltryptophanate on heat-induced aggregation of bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1479**: 32—36.
- ARTALI R., BOMBIERI G., CALABI L., DELPRA A., 2005: A molecular dynamic study of human serum albumin binding sites. II *Farmaco*, **60**: 485—495.
- ARTYUKHOV V.G., PANTYAVIN A.A., VASHANOV G.A., 2001: Vacuum — uv-radiation-induced structural — functional changes in serum albumin molecules. *J. Appl. Spectr.*, **68**: 291—298.
- AVDULOV N.A., CHOCHINA S.V., DARAGAN V.A., SCHROEDER F., MAYO K.H., WOOD W.G., 1996: Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: a fluorescent and ¹³C NMR multiplet relaxation study. *Biochemistry*, **35**: 340—347.
- BALNY C., MASSON P., HEREMANS K., 2002: High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**: 3—10.
- BANERJEE T., KISHORE N., 2005: Does the anesthetic 2,2,2-trifluoroethanol interact with bovine serum albumin by direct binding or by solvent-mediated effects? A calorimetric and spectroscopic investigation. *Biopolymers*, **78**: 78—86.
- BARONE G., GIANCOLA C., VERDOLIVA A., 1992: DSC studies on the denaturation and aggregation of serum albumins. *Thermochim. Acta*, **199**: 197—205.
- BARONE G., CAPASSO S., DEL VECCHIO P., DE SENA C., FESSAS D., GIANCOLA C., GRAZIANO G., TRAMONTI P., 1995: Thermal denaturation of bovine serum albumin

- and its oligomers and derivatives pH dependence. *J. Therm. Anal.*, **45**: 1255—1264.
- BARTERI M., PALA A., ROTELLA S., 2005: Structural and kinetic effects of mobile phone microwaves on acetylcholinesterase activity. *Biophys. Chem.*, **113**: 245—253.
- BASOVA L.V., ILYINA N.B., VASSILENKO K.S., TIKTOPULO E.I., BYCHKOVA V.E., 2002: Conformational states of the water-soluble fragment of cytochrome *b*₅. I. pH-induced denaturation. *Mol. Biol.*, **36**: 718—725.
- BECKTEL W.J., SCHELLMAN J.A., 1987: Protein stability curves. *Biopolymers*, **26**: 1859—1877.
- BEHRENS P.Q., SPIEKERMAN A.M., BROWN J.R., 1975: Structure of human serum albumin. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **34**: 591—591.
- BERTUCCI C., DOMENICI E., 2002: Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: Methodological approaches and physiological relevance. *Curr. Med. Chem.*, **9**: 1463—1481.
- BHATTACHARYA A.A., GRUNE T., CURRY S., 2000: Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.*, **303**: 721—732.
- BHATTACHARYA A.A., CURRY S., FRANKS N.P., 2000: Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. *J. Biol. Chem.*, **275**: 38 731—38 738.
- BIAN H., LI M., YU Q., CHEN Z., TIAN J., LIANG H., 2006: Study of the interaction of artemisinin with bovine serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **39**: 291—297.
- BLEUSTEIN C.B., FELSEN D., POPPAS P., 2000 a: Welding characteristics of different albumin species with and without fatty acids. *Lasers Surg. Med.*, **27**: 82—86.
- BLEUSTEIN C.B., SENNETT M., KUNG R.T.V., FELSEN D., POPPAS P., STEWART R.B., 2000 b: Differential scanning calorimetry of albumin solders: interspecies differences and fatty acid binding effects on protein denaturation. *Lasers Surg. Med.*, **27**: 465—470.
- BOCEDI A., NOTARIL S., NARCISO P., BOLLI A., FASANO M., ASCENZI P., 2004: Binding of anti-HIV drugs to human serum albumin. *IUBMB Life*, **56**: 609—614.
- BOHR H., BOHR J., 2000: Microwave enhanced kinetics observed in ORD studies of a protein. *Bioelectromagnetics*, **21**: 68—72.
- BOHR H., BOHR J., 2000: Microwave-enhanced folding and denaturation of globular proteins. *Phys. Rev., E* **61**: 4310—4314.
- BOONYARATANAKORNKIT B.B., PARK C.B., CLARK D.S., 2002: Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**: 235—249.
- BRILL A.S., CASTLEMAN B.W., MCKNIGHT M.E., 1976: Association of methanol and ethanol with heme proteins. *Biochemistry*, **15**: 2309—2316.
- BROWN J.R., 1975: Structure of bovine serum albumin. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **34**: 591—591.
- BULONE D., MARTORANA V., SAN BIAGIO P.L., 2001: Effects of intermediates on aggregation of native bovine serum albumin. *Biophys. Chem.*, **91**: 61—69.
- CALANDRINI V., ONORI G., SANTUCCI A., 2000: Effect of 1-alkanols on the native conformation of Lysozyme. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2**: 4143—4146.

- CALANDRINI V., ONORI G., SANTUCCI A., 2001: Examination by dynamic light scattering of lysozyme in water/alcohol mixtures. *J. Mol. Struct.*, **565—566**: 183—188.
- CARTER D.C., HE X.M., MUNSON S.H., TWIGG P.D., GERNERT K.M., BROOM M.B., MILLER T.Y., 1989: Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*, **244**: 1195—1198.
- CARTER D.C., HO J.X., 1994: Structure of serum albumin. *Adv. Prot. Chem.*, **45**: 153—203.
- CARUGO O., CARUGO K.D., 2005: When X-ray modify the protein structure: radiation damage at work. *Trends Biochem. Sci.*, **30**: 213—219.
- CELEJ M.S., DASSIE S.A., FREIRE E., BIANCONI M.L., FIDELIO G.D., 2005: Ligand-induced thermostability in proteins: Thermodynamic analysis of ANS-albumin interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1750**: 122—133.
- CHEBOTAREVA N.A., KURGANOV B.I., LIVANOVA N.B., 2004: Biochemical effects of molecular crowding. *Biochemistry (Moscow)*, **69**: 1239—1251.
- CHEN Q.X., ZHANG R.Q., YANG P.Z., LI Y., CHEN S.L., LI S., YANG Y., ZHOU H.M., 1999: Effect of ethanol on the activity and conformation of *Penaeus penicilltus* acid phosphatase. *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**: 103—107.
- CHENG R., TSUNEHIRO J., UCHIDA K., KAWAKISHI S., 1991: Oxidative damage of glycosylated protein in the presence of transition metal ion. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 1993—1998.
- CHO Y., SONG K.B., 2000: Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin and β -lactoglobulin. *Biochem. Mol. Biol.*, **33**: 133—137.
- CIEŚLA K., ROSS Y., GŁUSZEWSKI W., 2000: Denaturation processes in gamma irradiated proteins studied by differential scanning calorimetry. *Radiat. Phys. Chem.*, **58**: 233—243.
- CLYDESDALE G.J., DANDIE G.W., MULLER H.K., 2001: Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell. Biol.*, **79**: 547—568.
- COOPER A., MCAULEY-HECHT K.E., 1993: Microcalorimetry and the molecular recognition of peptides and proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., A* **345**: 23—35.
- COOPER A., 1999: Thermodynamic of protein folding and stability, "Protein: A Comprehensive Treatise", Vol. 2. Ser. Editor: Geoffrey Allen Publisher: JAI Press Inc. pp. 217—270.
- COOPER A., NUTLEY M.A., WADOOD A., 2000: Differential scanning microcalorimetry. In: *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamic and calorimetry*. Eds. S.E. HARDING, B.Z. CHOWDHRY. Oxford—New York: Oxford University Press, p. 287.
- COOPER B.F., SIDERAKI V., WILSON D.K., 1997: The role of divalent cations in structure and function of murine adenosine deaminase. *Protein Sci.*, **6**: 1031—1037.
- CROFT R.J., CHANDLER J.S., BURGESS A.P., BARRY R.J., WILLIAMS J.D., CLARKE A.R., 2002: Acute mobile phone operation affects neural function in humans. *Clin. Neurophysiol.*, **113**: 1623—1632.
- CUI Y.F., BAI G.Y., LI C.G., YE C.H., LIU M.L., 2004: Analysis of competitive binding of ligands to human serum albumin using NMR relaxation measurements. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **34**: 247—254.
- CURRY S., MANDELKOV H., BRICK P., FRANKS N.P., 1998: Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Struct. Biol.*, **5**: 827—835.

- CURRY S., BRICK P., FRANKS N.P., 1999: Fatty acid binding to human serum albumin: new insight from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1441**: 131—140.
- D'ANGELO M., ONORI G., SANTUCCI A., 1994: Self-association of monohydric alcohols in water: Compressibility and infrared absorption measurements. *J. Chem. Phys.*, **100**: 3107—3113.
- D'AURIA S., BARONE R., NUCCI R., BARONE G., FESSAS D., BERTOLI E., TANFANI F., 1997: Effects of temperature and SDS on the structure of β -glycosidase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.*, **323**: 833—840.
- DAVIES K.J.A., DELSIGNORE M.E., 1987: Protein damage and degradation by oxygen radicals III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9908—9913.
- DAYER M.R., MOOSAVI-MOVAHEDI A.A., NOROUZI P., GHOURCHIAN H., SAFARIAN S., 2002: Inhibition of human hemoglobin autooxidation by Sodium *n*-Dodecyl Sulphate. *Biochem. Mol. Biol.*, **35**: 364—370.
- DEEP S., AHLUWALIA J.C., 2001: Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **3**: 4583—4591.
- DELLA GATTA G., RICHARDSON M.J., SARGE S.M., STØLEN S., 2006: Standards, calibration, and guidelines in microcalorimetry. Part 2. Calibration standards for differential scanning calorimetry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, **78**: 1455—1476.
- DESPHANDE A., NIMSADKAR S., MANDE S.C., 2005: Effect of alcohols on protein hydration: crystallographic analysis of hen egg-white lysozyme in the presence of alcohols. *Biol. Cryst. Acta Cryst., D* **61**: 1005—1008.
- DILL K.A., 1990: Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, **29**: 7133—7155.
- DOCKAL M., CARTER C., RÜKER F., 1999: The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.*, **274**: 29 303—29 310.
- DOCKAL M., CARTER C., RÜKER F., 2000 a: Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *J. Biol. Chem.*, **275**: 3042—3050.
- DOCKAL M., CHANG M., CARTER D.C., RÜKER F., 2000 b: Five recombinant fragments of human serum albumin—tools for the characterization of the warfarin binding site. *Protein Sci.*, **9**: 1455—1465.
- DONNELAN M., MCKENZIE D.R., FRENCH P.W., 1997: Effects of exposure to electromagnetic radiation at 835 MHz on growth, morphology and secretory characteristics of a mast cell analogue, RBL-2H3. *Cell. Biol. Int.*, **21**: 427—439.
- DUFOUR E., BERTRAND-HARB C., HAERTLÉ T., 1993: Reversible effects of medium dielectric constant on structural transformation of β -lactoglobulin and its retinol binding. *Biopolymers*, **33**: 589—598.
- DURCHSCHLAG H., FOCHLER C., FESER B., HAUSMANN S., SERONEIT T., SWIENTEK M., SWOBODA E., WINKLMAIR A., WLČEK C., ZIPPER P., 1996: Effects of X- and UV-irradiation on proteins. *Phys. Chem.*, **47**: 501—505.
- DWYER D.S., BRADLEY R.J., 2000: Chemical properties of alcohols and their protein binding sites. *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**: 265—275.

- ELLIS R.J., 2001: Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**: 114—119.
- EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. Directorate C — Public Health and Risk Assessment, C7 — Risk assessment. SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR), Preliminary Opinion on Possible effects of Electromagnetic Fields (EMF) on Human Health, 19 July 2006, 1—58.
- FÁGAIN C.Ó., 1995: Understanding and increasing protein stability. *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**: 1—14.
- FARRUGGIA B., PICÓ G.A., 1999: Thermodynamic features of the chemical and thermal denaturations of human serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**: 317—323.
- FAUCETTE K.J., PARKER C.J., MCCLUSKEY T., BERNSHAW N.J., RODGERS G.M., 1992: Induction of tissue factor activity in endothelial cells and monocytes by a modified form of albumin present in normal human plasma. *Blood*, **79**: 2888—2895.
- FERRER M.L., DUCHOWICZ R., CARRASCO B., GARCIA DE LA TORRE J., ACUÑA A.U., 2001: The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. *Biophys. J.*, **80**: 2422—2430.
- FESSAS D., CIEŚLA K., SCHIRALDI A., 1998: γ -radiation effects on the thermal stability of bovine γ -globulin. *J. Therm. Anal.*, **52**: 745—751.
- FESSAS D., IAMETTI S., SCHIRALDI A., BONOMI F., 2001: Thermal unfolding of monomeric and dimeric β -lactoglobulins. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 5439—5448.
- FINKELSTEIN A.V., PTITSYN O.B., 2002: Protein physics. Academic Press.
- FRANKS F., 1995: Protein destabilization at low temperatures. *Adv. Protein Chem.*, **46**: 105—139.
- FREIRE E., BILTONEN R.L., 1978 a: Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogenous systems. *Biopolymers*, **17**: 463—479.
- FREIRE E., BILTONEN R.L., 1978 b: Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. II. General treatment of cooperative phenomena. *Biopolymers*, **17**: 481—496.
- FREIRE E., 1994: Statistical thermodynamic analysis of Differential Scanning Calorimetry data: structural deconvolution of heat capacity function of proteins. *Methods Enzymol.*, **240**: 502—529.
- FREIRE E., 1995: Differential Scanning Calorimetry. *Methods Mol. Biol.*, **40**: 191—218.
- FRYE K.J., ROYER C.A., 1998: Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under pressure. *Protein Sci.*, **7**: 2217—2222.
- GABALDÓN M., 2002: Preparation and characterization of bovine albumin isoforms. *Int. J. Biol. Macromol.*, **30**: 259—267.
- GALISTEO M.L., MATEO P.L., SANCHEZ-RUIZ J.M., 1991: Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, **30**: 2061—2066.
- GEORGALIS Y., UMBACH P., ZIELENKIEWICZ A., UTZIG E., ZIELENKIEWICZ P., SEANGER W., 1997: Microcalorimetric and small-angle light scattering studies on nucleating lysozyme solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**: 11 959—11 965.

- GHUMAN J., ZUNSZAIN P.A., PETIPTAS I., BHATTACHARYA A.A., OTAGIRI M., CURRY S., 2005: Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.*, **353**: 38—52.
- GIANCOLA C., DE SENNA C., FESSAS D., GRAZIANO G., BARONE G., 1997: DSC studies on bovine serum albumin denaturation. Effects of ionic strength and SDS concentration. *Int. J. Biol. Macromol.*, **20**: 193—197.
- GMELIN E., SARGE S.M., 2000: Temperature, heat and heat flow rate calibration of differential scanning calorimeters. *Thermochim. Acta*, **347**: 9—13.
- GOMEZ J., HILSER V.J., XIE D., FREIRE E., 1995: The heat capacity of proteins. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **22**: 404—412.
- GRIKO Y., PRIVALOV P.L., 1992: Calorimetric study of the heat and cold denaturation of β -lactoglobulin. *Biochemistry*, **31**: 8810—8815.
- GRIKO Y.V., FREIRE E., PRIVALOV G., VAN DAEL H., PRIVALOV P.L., 1995: The unfolding thermodynamics of c-type lysozymes: A calorimetric study of the heat denaturation of equine lysozyme. *J. Mol. Biol.*, **252**: 447—459.
- GRYZUNOV Y.A., ARROYO A., VIGNE J.L., ZHAO Q., TYURIN V.A., HUBEL C.A., GANDLEY R.E., VLADIMIROV Y.A., TAYLOR R.N., KAGAN V.E., 2003: Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **413**: 53—66.
- GUMPEN S., HEGG P.O., MARTENS H., 1979: Thermal stability of fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta*, **574**: 189—196.
- HA CH.E., PETERSEN CH.E., PARK D.S., HAROHALLI K., BHAGAVAN N.V., 2000: Investigations of the effects of ethanol on warfarin binding to human serum albumin. *J. Biomed. Sci.*, **7**: 114—121.
- HAMADA D., KURODA Y., TANAKA T., GOTO Y., 1995: High helical propensity of the peptide fragments derived from β -lactoglobulin, a predominantly β -sheet protein. *J. Mol. Biol.*, **254**: 737—746.
- HARANO Y., KINOSHITA M., 2006: On the physics of pressure denaturation of proteins. *J. Phys.: Condens. Matter*, **18**: L107—L113.
- HE X.M., CARTER D.C., 1992: Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, **358**: 209—215.
- HERSKOVITS T.T., GADEGBEKEU B., JAILLET H., 1970 a: On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. *J. Biol. Chem.*, **245**: 2588—2598.
- HERSKOVITS T.T., JAILLET H., GADEGBEKEU B., 1970 b: On the structural stability and solvent denaturation of proteins. II. Denaturation by the ureas. *J. Biol. Chem.*, **245**: 4544—4550.
- HERSKOVITS T.T., JAILLET H., DESENA A.T., 1970 c: On the structural stability and solvent denaturation of proteins. III. Denaturation by the amides. *J. Biol. Chem.*, **245**: 6511—6517.
- HINZ H.J., SCHWARZ F.P., 2001: Measurement and analysis of results obtained on biological substances with d.s.c. *J. Chem. Thermodynamics*, **33**: 1511—1525.

- HIROTA-NAKAOKA N., GOTO Y., 1999: Alcohol-induced denaturation of β -lactoglobulin: A close correlation to the alcohol-induced α -helix formation of melittin. *Bioorg. Medicinal Chem.*, **7**: 67—73.
- HONORÉ B., PEDERSEN A.O., 1989: Conformational changes in human serum albumin studied by fluorescence and absorption spectroscopy. *Biochem. J.*, **258**: 199—204.
- HU T., SU Z., 2003: A solid phase adsorption method for preparation of bovine serum albumin/bovine hemoglobin conjugate. *J. Biotechnol.*, **100**: 267—275.
- HUANG K., 2005: *Statistical physics and protein folding*. Pte. Ltd., World Scientific Publishing Co.
- HUNG H.C., CHANG G.G., 1998: Biphasic denaturation of human placental alkaline phosphatase in guanidinium chloride. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **33**: 49—61.
- ILHAN A., GUREL A., ARMUTCU F., KAMISLI S., IRAZ M., AKYOL O., OZEN S., 2004: *Ginkgo biloba* prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clin. Chim. Acta*, **340**: 153—162.
- JACKSON M.B., 2006: *Molecular and Cellular Biophysics*. Cambridge University Press.
- JAENICKE R., 2000: Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J. Biotechnol.*, **79**: 193—203.
- JELESAROV I., BOSSHARD H.R., 1999: Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.*, **12**: 3—18.
- JOHNSON F.H., CAMPBELL D.H., 1946: Pressure and protein denaturation. *J. Biol. Chem.*, **689**—698.
- KADI N.EL., TAULIER N., LE HUÉROU J.Y., GINDRE M., URBACH W., Nwigwe I., KAHN P.C., WAKS M., 2006: Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: Ultrasound and structural studies. *Biophys. J.*, **91**: 3397—3404.
- KANG E., SINGH J., 2003: Conformational stability of a model protein (bovine serum albumin) during primary emulsification process of PLGA microspheres synthesis. *Int. J. Pharm.*, **260**: 149—156.
- KHAN M.Y., 1986: Direct evidence for the involvement of domain III in the N-F transition of bovine serum albumin. *Biochem. J.*, **236**: 307—310.
- KHECHINASHVILI N.N., PRIVALOV P.L., TIKTOPULO E.J., 1973: Calorimetric investigation of lysozyme thermal denaturation. *FEBS Lett.*, **30**: 57—60.
- KIDOKORO S.I., WADA A., 1987: Determination of thermodynamic functions from scanning calorimetry data. *Biopolymers*, **26**: 213—229.
- KIDOKORO S.I., UEDAIRA H., WADA A., 1988: Determination of thermodynamic functions from scanning calorimetry data II: For the system that includes self-dissociation/association process. *Biopolymers*, **27**: 271—297.
- KLEMM W.R., 1998: Biological water and its role in the effects of alcohol. *Alcohol*, **15**: 249—267.
- KOHN W.D., KAY C.M., HODGES R.S., 1997: Salt effects on protein stability: two-stranded alpha-helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs. *J. Mol. Biol.*, **267**: 1039—1052.
- KOSA T., MARUYAMA T., OTAGIRI M., 1997: Species differences of serum albumins I. Drug binding sites. *Pharm. Res.*, **14**: 1607—1612.

- KOSA T., MARUYAMA T., OTAGIRI M., 1998a: Species differences of serum albumins II. Chemical and thermal stability. *Pharm. Res.*, **15**: 449—454.
- KOSA T., MARUYAMA T., SAKAI N., YONEMURA N., YAHARA S., OTAGIRI M., 1998 b: Species differences of serum albumins III. Analysis of structural characteristics and ligand binding properties during N-B transitions. *Pharm. Res.*, **15**: 592—598.
- KOSHLAND D.E., 1998: Conformational changes: How small is big enough? *Nature Medicine*, **4**: 1112—1114.
- KRAGH-HANSEN U., 1981: Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacol. Rev.*, **33**: 17—53.
- KRAGH-HANSEN U., CHUANG V.T.G., OTAGIRI M., 2002: Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**: 695—704.
- KRAGH-HANSEN U., SAITO S., NISHI K., ANRAKU M., OTAGIRI M., 2005: Effect of genetic variation on the thermal stability of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1747**: 81—88.
- KRUSE S.W., ZHAO R., SMITH D.P., JONES D.N.M., 2003: Structure of a specific alcohol-binding site defined by the odorant binding protein LUSH from *Drosophila melanogaster*. *Nature Struct. Biol.*, **10**: 694—700.
- KURGANOV B.I., LYUBAREV A.E., SANCHEZ-RUIZ J.M., SHNYROV V.L., 1997: Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins. Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation. *Biophys. Chem.*, **69**: 125—135.
- LADBURY J.E., CHOWDHRY B.Z., 1998: Biocalorimetry. Applications of calorimetry in the biological science. Chichester: John Wiley & Sons.
- LAKSHMAN M.R., RAO M.N., MARMILLOT P., 1999: Alcohol and molecular regulation of protein glycosylation and function. *Alcohol*, **19**: 239—247.
- LAURENCE J.A., FRENCH P.W., LINDNER R.A., MCKENZIE D.R., 2000: Biological effects of electromagnetic field-mechanisms for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation. *J. Theor. Biol.*, **206**: 291—298.
- LAURENCE J.A., MCKENZIE D.R., FOSTER K.R., 2003: Application of the heat equation to the calculation of temperature rises from pulsed microwave exposure. *J. Theor. Biol.*, **222**: 403—405.
- LEE J.W., YOON H.S., LEE K.H., KIM J.H., KIM W.J., BYUN M.W., 2000: Conformational changes of myosin by gamma irradiation. *Rad. Phys. Chem.*, **58**: 271—277.
- LEE Y., SONG K.B., 2002: Effect of γ -irradiation on the molecular properties of myoglobin. *Biochem. Mol. Biol.*, **35**: 590—594.
- LI Q., MACDONALD S., BIENEK C., FOSTER P.R., MACLEOD A.J., 2005: Design of a UV-C irradiation process for the inactivation of viruses in protein solutions. *Biologicals*, **33**: 101—110.
- LIN S.Y., CHO CH.J., LI M.J., 1999: UV-B-induced secondary conformational changes in lens α -crystallin. *J. Photochem. Photobiol.*, **49**: 29—34.
- LIN S.Y., LI M.J., WEI Y.S., 2004 a: Ethanol or/and captopril-induced precipitation and secondary conformational changes of human serum albumin. *Spectrochim. Acta, Part A*, **60**: 3107—3111.

- LIN S.Y., WEI Y.S., LI M.J., WANG S.L., 2004 b: Ethanol or/and captopril on the secondary structure of human serum albumin before and after protein binding. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**: 457—464.
- LOLADZE V.V., ERMOLENKO D.N., MAKHATADZE G.I., 2001: Heat capacity changes upon burial of polar and nonpolar groups in proteins. *Protein Sci.*, **10**: 1343—1352.
- LONGSTRETH J., DE GRUIJ F.R., KRIPKE M.L., ABSECK S., ARNOLD F., SLAPER H.I., VELDEERS G., TAKIZAWA VANDERLEUN Y., 1998: Health risks. *J. Photochem. Photobiol.*, B **46**: 20—39.
- LOPEZ A., BOZZI A., MASCOLO G., KIWI J., 2003: Kinetic investigation on UV and UV/H₂O₂ degradations of pharmaceutical intermediates in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **156**: 121—126.
- LU X.L., ZHENG CH.Y., SHI X.D., WANG Y.Q., SUO X.Y., YU P.Z., XU Y.H., MA T.M., SU Z.G., 2005: Conjugate of bovine hemoglobin and human serum albumin as a candidate for blood substitute: Characteristics and effects on rats. *Artif. Cells, Blood Subst. Biotechnol.*, **33**: 83—99.
- LUBAS B., SOŁTYSIK-RASEK M., LEŚNIEWSKA I., 1979: Proton Nuclear Magnetic Resonance study of the association of monovalent and divalent alcohols with bovine serum albumin. *Biochemistry*, **18**: 4943—4951.
- LOZANO P., DE DIEGO T., IBORRA J.L., 1997: Dynamic structure: function relationships in the alpha-chymotrypsin deactivation process by heat and pH. *Eur. J. Biochem.*, **248**: 80—85.
- LYUBAREV A.E., KURGANOV B.I., BURLAKOVA A.A., ORLOV V.N., 1998: Irreversible thermal denaturation of uridine phosphorylase from *Escherichia coli* K-12. *Biophys. Chem.*, **70**: 247—257.
- LYUBAREV A.E., KURGANOV B.I., 2000: Analysis of DSC data relating to proteins undergoing irreversible thermal denaturation. *J. Therm. Anal. Cal.*, **62**: 51—62.
- MAHESHA H.G., SRIDEVI SINGH A., SRINIVASAN N., APPU RAO A.G., 2006: A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin. *FEBS Journal*, **273**: 451—467.
- MAKHATADZE G.I., PRIVALOV P.L., 1990: Heat capacity of proteins I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solutions: Hydration effect. *J. Mol. Biol.*, **213**: 375—384.
- MAKHATADZE G.I., PRIVALOV P.L., 1992: Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *J. Mol. Biol.*, **226**: 491—505.
- MAKHATADZE G.I., PRIVALOV P.L., 1993: Contribution of hydration to protein folding thermodynamics I. The enthalpy of hydration. *J. Mol. Biol.*, **232**: 639—659.
- MAKHATADZE G.I., PRIVALOV P.L., 1995: Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.*, **47**: 307—425.
- MAKHATADZE G.I., 1998: Heat capacities of amino acids, peptides and proteins. *Biophys. Chem.*, **71**: 133—156.
- MAYR L.M., SCHMID F.X., 1993: Stabilization of a protein by guanidinium chloride. *Biochemistry*, **32**: 7994—7998.
- MATEO P.L., PRIVALOV P.L., 1981: Pepsinogen denaturation is not a two-state transition. *FEBS Lett.*, **123**: 189—192.

- MELO E.P., AIRES-BARROS M.R., COSTA S.M., CABRAL J.M., 1997: Thermal unfolding of proteins at high pH range studied by UV absorbance. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **34**: 45—59.
- MELOUN B., MORAVEK L., KOSTKA V., 1975: Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett.*, **58**: 134—137.
- MERAL I., MERT H., MERT N., DEGER Y., YORUK I., YETKIND A., KESKIN S., 2007: Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs. *Brain Res.*, **1169**: 120—124.
- MICHNIK A., LUBAS B., 1986: Association of monoalkylureas with bovine serum albumin: ^1H NMR study. *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**: 289—293.
- MICHNIK A., 2003: Thermal stability of bovine serum albumin DSC study. *J. Therm. Anal. Cal.*, **71**: 509—519.
- MICHNIK A., MICHALIK K., 2004: Thermal stability of bovine serum albumin exposed to the action of uv radiation. *Phys. Med.*, Vol. 20. *Suppl.*, **1**: 111—113.
- MICHNIK A., KŁOS A., DRZAZGA Z., 2004: The influence of radio-frequency radiation on thermal stability of bovine serum albumin in aqueous solution. *J. Therm. Anal. Cal.*, **77**: 269—277.
- MICHNIK A., MICHALIK K., DRZAZGA Z., 2005 a: Study of stability of bovine serum albumin at different pH. *J. Therm. Anal. Cal.*, **80**: 399—406.
- MICHNIK A., DRZAZGA Z., KLUCZEWSKA A., MICHALIK K., 2005 b: Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin. *Biophys. Chem.*, **118**: 93—101.
- MICHNIK A., MICHALIK K., KLUCZEWSKA A., DRZAZGA Z., 2006 a: Comparative DSC study of human and bovine serum albumin. *J. Therm. Anal. Cal.*, **84**: 113—117.
- MICHNIK A., MICHALIK K., DRZAZGA Z., 2006 b: DSC study of human serum albumin ageing processes in aqueous and low concentration ethanol solutions. *Polish J. Environ. Stud.*, **15**: 81—83.
- MICHNIK A., 2007 a: DSC study of the association of ethanol with human serum albumin. *J. Therm. Anal. Cal.*, **87**: 91—96.
- MICHNIK A., DRZAZGA Z., 2007 b: Effect of ethanol on the thermal stability of human serum albumin. *J. Therm. Anal. Cal.*, **88**: 449—454.
- MICHNIK A., MICHALIK K., DRZAZGA Z., 2008: Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin. *J. Photochem. Photobiol.*, B **90**: 170—178.
- MILARDI D., LA ROSA C., GRASSO D., 1994: Extended theoretical analysis of irreversible protein thermal unfolding. *Biophys. Chem.*, **52**: 183—189.
- MILARDI D., LA ROSA C., GRASSO D., 1996: Theoretical basis for differential scanning calorimetric analysis of multimeric proteins. *Biophys. Chem.*, **62**: 95—108.
- MILLER I., GEMEINER M., 1993: Peculiarities in electrophoretic behaviour of different albumins. *Electrophoresis*, **14**: 1312—1317.
- MINTON A.P., 2001: The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J. Biol. Chem.*, **276**: 10 577—10 580.

- MINTON A.P., 2005: Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: macromolecular crowding and protein stability revisited. *Biophys. J.*, **88**: 971—985.
- MISRA R.B., RAY R.S., HANS R.K., 2005: Effect of UVB radiation on human erythrocytes *in vitro*. *Toxicol. in Vitro*, **19**: 433—438.
- MOLINA-PEREZ M., GONZALEZ-REIMERS E., SANTOLARIA-FERNANDEZ F., MARTINEZ-RIERA A., RODRIGUEZ-MORENO F., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ E., MILENA-ABRIL A., VELASCO-VAZQUEZ J., 2000: Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on bone histology and mineral metabolism. *Alcohol*, **20**: 1—8.
- MONKOS K., 2004: On the hydrodynamics and temperature dependence of the solution conformation of human serum albumin from viscometry approach. *Biochim. Biophys. Acta*, **1700**: 27—34.
- MOOSAVI-MOVAHEDI A.A., NAZARI K., SABOURY A.A., 1997: Denaturation of horseradish peroxidase with sodium *n*-dodecyl sulphate and dodecyl trimethyl ammonium bromide. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, **9**: 123—130.
- MORTON C.J., LADBURY J.E., 1996: Water mediated protein — DNA interactions: The relationship of thermodynamics to structural detail. *Protein Sci.*, **5**: 2115—2118.
- MUHOBERAC B.B., SHELNUTT J.A., ONDRIAS M.R., 1988: A resonance Raman study of the binding of ethanol and methanol to ferrihemoglobin. *FEB*, **228**: 310—316.
- MURPHY K.P., PRIVALOV P.L., GILL S.J., 1990: Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. *Science*, **247**: 559—561.
- MURPHY K.P., GILL S.J., 1991: Solid model compounds and the thermodynamics of protein unfolding. *J. Mol. Biol.*, **222**: 699—709.
- MUZAMMIL S., KUMAR Y., TAYYAB S., 2000: Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation. *Proteins: Struct., Funct. Genet.*, **40**: 29—38.
- MYERS J.K., PACE C.N., 1996: Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophys. J.*, **71**: 2033—2039.
- National Radiological Protection Board, 2002: Health effect from ultraviolet radiation, Report of an Advisory Group on Non-ionising Radiation. Documents of the NRPB, **13**: 1—292.
- NAVE C., 1995: Radiation damage in protein crystallography. *Radiat. Phys. Chem.*, **45**: 483—490.
- NAZARI K., SABOURY A.A., MOOSAVI-MOVAHEDI A.A., 1997: Enthalpy investigation for elucidation of the transition concentration for the interaction of horseradish peroxidase with surfactants. *Thermochim. Acta.*, **302**: 131—135.
- NEIRA J.L., GÓMEZ J., 2004: The conformational stability of the *Streptomyces coelicolor* histidine-phosphocarrier protein. Characterization of cold denaturation and urea-protein interactions. *Eur. J. Biochem.*, **271**: 2165—2181.
- NIELSEN H., KRAGH-HANSEN U., MINCHIOTTI L., GALIANO M., BRENNAN S.O., TÁRNOKY A.L., FRANCO M.H.L.P., SALZANO F.M., SUGITA O., 1997: Effect of genetic variation on the fatty acid-binding properties of human serum albumin and proalbumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1342**: 191—204.

- OBERG K.A., UVERSKY V.N., 2001: Secondary structure of the homologous proteins, alpha-fetoprotein and serum albumin, from their circular dichroism and infrared spectra. *Protein and Peptide Letters*, **8**: 297—302.
- ONORI G., SANTUCCI A., 1996: Dynamical and structural properties of water/alcohol mixtures. *J. Mol. Liquids*, **69**: 161—181.
- OZGUNER F., ALTINBAS A., OZAYDIN M., DOGAN A., VURAL H., KISIOGLU A.N., CESUR G., YILDIRIM N.G., 2005: Mobile phone-induced myocardial oxidative stress: protection by a novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol. Ind. Health*, **21**: 223—230.
- PACE C.N., SHIRLEY B.A., MCNUTT M., GAJIWALA K., 1996: Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.*, **10**: 75—83.
- PETERS T., 1985: Serum albumin. *Adv. Protein Chem.*, **37**: 161—245.
- PETITPAS I., GRUNE T., BHATTACHARYA A.A., CURRY S., 2001: Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Mol. Biol.*, **314**: 955—960.
- PICÓ G.A., 1997: Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **20**: 63—73.
- PIEKARSKI H., TKACZYK M., 1995: Thermochemical properties of electrolyte solutions in 2-Alkoxyethanol-water mixtures. *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, **91**: 2299—2306.
- PIEKARSKI H., 2004: Calorimetry — an important tool in solution chemistry. *Thermochim. Acta*, **420**: 13—18.
- POLK CH., POSTOW E., 1996: Handbook of biological effects of electromagnetic fields. Boca Raton. CRC Press LLC.
- PORCELLI M., CACCIAPUOTI G., FUSCO S., MASSA R., D'AMBROSIO G., BERTOLDO C., DE ROSA M., ZAPPIA V., 1997: Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. *FEBS Letters*, **402**: 102—106.
- PRA BHU N.V., SHARP K.A., 2005: Heat capacity in proteins. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **56**: 521—548.
- PRIVALOV P.L., 1979: Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Protein Chem.*, **33**: 167—2044.
- PRIVALOV P.L., 1982: Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Protein Chem.*, **35**: 1—104.
- PRIVALOV P.L., POTEKHIN S.A., 1986: Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol.*, **131**: 4—51.
- PRIVALOV P.L., GRIKO YU.V., VENYAMINOV S.YU., KUTYSHENKO V.P., 1986: Cold denaturation of myoglobin. *J. Mol. Biol.*, **190**: 487—498.
- PRIVALOV P.L., GILL S.J., 1988: Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *J. Adv. Protein Chem.*, **39**: 191—234.
- PRIVALOV P.L., MAKHATADZE G.I., 1990: Heat capacity of proteins II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: Protein unfolding effects. *J. Mol. Biol.*, **213**: 385—391.
- PRIVALOV P.L., MAKHATADZE G.I., 1992: Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding. *J. Mol. Biol.*, **224**: 715—723.

- PRIVALOV P.L., MAKHATADZE G.I., 1993: Contribution of hydration to protein folding thermodynamics II. The entropy and Gibbs energy of hydration. *J. Mol. Biol.*, **232**: 660—679.
- PRIVALOV P.L., 1996: Intermediate states in protein folding. *J. Mol. Biol.*, **258**: 707—725.
- PRIVALOV P.L., 1997: Thermodynamics of protein folding. *J. Chem. Thermodynamics*, **29**: 447—474.
- PRIVALOV P.L., DRAGAN A.I., 2007: Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophys. Chem.*, **126**: 16—24.
- REMMELE R.L., NIGHTLINGER N.S., SRINIVASAN S., GOMBOTZ W.R., 1998: Interleukin-1 receptor (IL-1R) liquid formulation development using differential scanning calorimetry. *Pharm. Res.*, **15**: 200—208.
- REPACHOLI M.H., 1998: Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*, **19**: 1—19.
- REŠČIČ J., VLACHY V., JAMNIK A., GLATTER O., 2001: Osmotic pressure, small-angle X-ray, and dynamic light scattering studies of human serum albumin in aqueous solutions. *J. Coll. Int. Sci.*, **239**: 49—57.
- ROBERTSON A.D., MURPHY K.P., 1997: Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem. Rev.*, **97**: 1251—1267.
- RODRIGUEZ-LARREA D., MINNING S., BORCHERT T.V., SANCHEZ-RUIZ J.M., 2006: Role of salvation barriers in protein kinetic stability. *J. Mol. Biol.*, **360**: 715—724.
- RÖSGEN J., HINZ H.J., 2001: Folding energetics of ligand binding proteins I: theoretical model. *J. Mol. Biol.*, **306**: 809—824.
- ROSS P.D., FINLAYSON J.S., SHRAKE A., 1984: Thermal stability of human albumin measured by differential scanning calorimetry. II. Effects of isomers of N-Acetyltryptophanate, pH, reheating and dimerization. *Vox Sang*, **47**: 19—27.
- ROSS P.D., SHRAKE A., 1988: Decrease in stability of human albumin with increase in protein concentration. *J. Biol. Chem.*, **263**: 11 196—11 202.
- ROYER C.A., 2002: Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**: 201—209.
- ROYER C.A., 2005: Insights into the role of hydration in protein structure and stability obtained through hydrostatic pressure studies. *Brazil. J. Med Biol. Res.*, **38**: 1167—1173.
- SADLER P.J., TUCKER A., 1993: pH-induced structural transitions of bovine serum albumin. Histidine pK_a values and unfolding of the N-terminus during the N to F transition. *Eur. J. Biochem*, **212**: 811—817.
- SANCHEZ-RUIZ J.M., LOPEZ-LACOMBA J.L., CORTIJO M., MATEO P.L., 1988: Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry*, **27**: 1648—1652.
- SANCHEZ-RUIZ J.M., 1992: Theoretical analysis of Lumry — Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys. J.*, **61**: 921—935.
- SANCHEZ-RUIZ J.M., MAKHATADZE G.I., 2001: To charge or not to charge? *Trends Biotech.*, **19**: 132—135.
- SHELLMAN J.A., 1997: Temperature, stability, and the hydrophobic interactions. *Biophys. J.*, **73**: 2960—2964.

- SHI Z., KRANTZ B.A., KALLENBACH N., SOSNICK T.R., 2002: Contribution of hydrogen bonding to protein stability estimated from isotope effects. *Biochemistry*, **41**: 2120—2129.
- SHIRAKI K., NISHIKAWA K., GOTO Y., 1995: Trifluoroethanol-induced stabilization of the α -helical structure of β -lactoglobulin: Implication for non-hierarchical protein folding. *J. Mol. Biol.*, **245**: 180—194.
- SHRAKE A., FINLAYSON J.S., ROSS P.D., 1984: Thermal stability of human albumin measured by differential scanning calorimetry. I. Effects of Caprylate and N-Acetyltryptophanate. *Vox Sang*, **47**: 7—18.
- SHRAKE A., ROSS P.D., 1988: Biphasic denaturation of human albumin due to ligand redistribution during unfolding. *J. Biol. Chem.*, **263**: 15 392—15 399.
- SHRAKE A., ROSS P.D., 1990: Ligand-induced biphasic protein denaturation. *J. Biol. Chem.*, **265**: 5055—5059.
- SMELLER L., 2002: Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**: 11—29.
- SONI N., MARGARSON M., 2004: Albumin. Where are we now? *Current Anaesthesia & Critical Care*, **15**: 61—68.
- SPOLAR R.S., HA J.H., RECORD M.T., 1989: Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 8382—8385.
- STADLER N., LINDNER R.A., DAVIES M.J., 2004: Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**: 949—954.
- STANIFORTH R.A., BIGOTTI M.G., CUTRUZZOLA F., ALLOCATELLI C.T., 1998: Brunori M unfolding of apomyoglobin from *Aplysia limacina*: the effect of salt and pH on the cooperativity of folding/ *J. Mol. Biol.*, **275**: 133—148.
- STICKLE D.F., PRESTA L.G., DILL K.A., ROSE G.D., 1992: Hydrogen bonding in globular proteins. *J. Mol. Biol.*, **226**: 1143—1159.
- VAN STOKKUM I.H.M., LINSDELL H., HADDEN J.M., HAIS P.I., CHAPMAN D., BLOEMENDAL M., 1995: Temperature-induced changes in protein structures studied by Fourier transform infrared spectroscopy and global analysis. *Biochemistry*, **34**: 10 508—10 518.
- STRYER L., 2000: *Biochemia*. Red. AUGUSTYNIAK J., MICHEJDA J. Warszawa: PWN.
- STURTEVANT J.M., 1977: Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**: 2236—2240.
- STURTEVANT J.M., 1996: Calorimetric studies of biopolymers. *Protein Sci.*, **5**: 391—394.
- SUGIO S., KASHIMA A., MOCHIZUKI S., NODA M., KOBAYASHI K., 1999: Crystal structure of human serum albumin at 2,5 Å resolution. *Protein Eng.*, **12**: 439—446.
- SUŁKOWSKA A., BOJKO B., RÓWNICKA J., SUŁKOWSKI W., 2004: Competition of drugs to serum albumin in combination therapy. *Biopolymers*, **74**: 256—262.
- SUŁKOWSKA A., RÓWNICKA J., POZYCKA J., BOJKO B., SUŁKOWSKI W.W., 2005: The effect of concentration of guanidine hydrochloride on the sulfasalazine-serum albumin complex. *J. Mol. Struct.*, **744—747**: 775—779.

- SUŁKOWSKA A., RÓWNICKA J., POŻYCKA J., BOJKO B., SUŁKOWSKI W.W., 2006: Stability of the complex BSA-6-propyl-2-thiouracil in the presence of Gu.HCl and urea. *J. Mol. Struct.*, **792—793C**: 243—248.
- SUŁKOWSKA A., MACIĄZEK M., RÓWNICKA J., BOJKO B., SUŁKOWSKI W.W., 2007: Effect of temperature on the methotrexate-BSA interaction: spectroscopic study. *J. Mol. Struct.*, **834—836**: 162—169.
- SUNDD M., KUNDU S., JAGANNADHAM M.V., 2000: Alcohol-induced conformational transitions in Ervatamin C. An α -helix to β -sheet switchover. *J. Protein Chem.*, **19**: 169—176.
- SZWEDA-LEWANDOWSKA Z., PUCHAŁA M., LEYKO W., 1976: Effect of gamma irradiation on the structure and function of human hemoglobin. *Radiat. Res.*, **65**: 50—59.
- TAKAMUKU T., SAISHO K., NOZAWA S., YAMAGUCHI T., 2005: X-ray diffraction studies on methanol-water, ethanol-water, and 2-propanol-water mixtures at low temperatures. *J. Mol. Liquids*, **119**: 133—146.
- TAKEDA K., WADA A., YAMAMOTO K., MORIYAMA Y., AOKI K., 1989: Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment. *J. Protein Chem.*, **8**: 653—659.
- TANIEWSKA-OSIŃSKA S., PIEKARSKI H., 1984: Własności roztworów elektrolitów w rozpuszczalnikach niewodnych i mieszanych. W: *Elektrochemia granicy faz i środowisk jonogennych*. Red. W. LIBUSZ, E. DUTKIEWICZ. Warszawa: PWN, s. 15—36.
- TANIEWSKA-OSIŃSKA S., PIEKARSKI H., 1994: Termochemiczne własności roztworów elektrolitów. *Wiadomości Chemiczne*, **48**: 341—379.
- TANNER J.W., ECKENHOFF R.G., LIEBMAN P.A., 1999: Halothane, an inhalational anesthetic agent, increases folding stability of serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**: 46—56.
- TAYYAB S., KHAN N.J., KHAN M.A., KUMAR Y., 2003: Behavior of various mammalian albumins towards bilirubin binding and photochemical properties of different bilirubin-albumin complexes. *Int. J. Biol. Macromol.*, **31**: 187—193.
- TIKTOPULO E.I., PRIVALOV P.L., BORISENKO S.N., TROITSKY G.V., 1985: Microcalorimetric study of the domain organization of serum albumin. *Mol. Biol.*, **19**: 1072—1078.
- TRYNDA-LEMIESZ L., KOZŁOWSKI H., 1996: Some aspects of the interactions of adriamycin with human serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.*, **4**: 1709—1713.
- TRYNDA-LEMIESZ L., KARACZYN A., KEPPLER B.K., KOZŁOWSKI H., 2000: Studies on the interactions between human serum albumin and *trans*-imidazolium (bisindazole) tetrachlororuthenate (III). *J. Inorg. Biochem.*, **78**: 341—346.
- TRYNDA-LEMIESZ L., 2004: Paclitaxel-HSA interaction. Binding sites on HSA molecule. *Bioorg. Med. Chem.*, **12**: 3269—3275.
- TRYNDA-LEMIESZ L., ŁUCZKOWSKI M., 2004: Human serum albumin: spectroscopic studies of the paclitaxel binding and proximity relationships with cisplatin and adriamycin. *J. Inorg. Biochem.*, **98**: 1851—1856.
- TSAI A.M., VAN ZANTEN J.H., BETENBAUGH M.J., 1998: II. Electrostatic effect in the aggregation of heat-denatured RNase A and implications for protein additive design. *Biotechnol. Bioeng.*, **59**: 281—285.
- TUBIO G., NERLI B., PICÓ G., 2004: Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. *J. Chromatogr., B* **799**: 293—301.

- UVERSKY V.N., NARIZHNEVA N.V., KIRSCHSTEIN S.O., WINTER S., LOBER G., 1997: Conformational transitions provoked by organic solvents in beta-lactoglobulin: can a molten globule like intermediate be induced by the decrease in dielectric constant? *Fold. Des.*, **2**: 163—172.
- VALBERG P.A., 1997: Radio frequency radiation (RFR): the nature of exposure and carcinogenic potential. *Cancer Causes and Control*, **8**: 323—332.
- WANG W., 1999: Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharmaceutics*, **185**: 129—188.
- WANG J., MAUSER A., CHAO S.-F., REMINGTON K., TRECKMANN R., KAISER K., PIFAT D., HOTTA J., 2004: Virus inactivation and protein recovery in a novel ultraviolet-C reactor. *Vox Sang.*, **86**: 230—238.
- WANG S.L., LIN S.Y., LI M.J., WEI Y.S., HSIEH T.F., 2005: Temperature effect on the structural stability, similarity, and reversibility of human serum albumin in different states. *Biophys. Chem.*, **114**: 205—212.
- WATANABE Y., HORII I., NAKAYAMA Y., OSAWA T., 1991: Effect of cysteine on bovine serum albumin (BSA) denaturation induced by solar ultraviolet (UVA, UVB) irradiation. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**: 1796—1801.
- WATANABE H., KRAGH-HANSEN U., TANASE S., NAKAJOU K., MITARAI M., IWAO Y., MARUYAMA T., OTAGIRI M., 2001: Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. *Biochem. J.*, **357**: 269—274.
- WHITTEN S.T., GARCIA-MORENO E.B., 2000: pH dependence of stability of staphylococcal nuclease: evidence of substantial electrostatic interactions in the denatured state. *Biochemistry*, **39**: 14 292—14 304.
- WOOLFSON D.N., COOPER A., HARDING M.M., WILLIAMS D.H., EVANS P.A., 1993: Protein folding in the absence of the solvent ordering contribution to the hydrophobic interaction. *J. Mol. Biol.*, **229**: 502—511.
- WSZELAKA-RYLIK M., ZIELENKIEWICZ W., 2007: Thermodynamic investigation of salting effect of ovalbumin in various salts solutions. *J. Thermal Anal. Cal.*, **87**: 85—89.
- YAMASAKI M., YANO H., AOKI K., 1990: Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: I. Effects of pH and ionic strength. *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**: 263—268.
- YAMASAKI M., YANO H., AOKI K., 1991: Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: II. Effects of neutral salts and urea. *Int. J. Biol. Macromol.*, **13**: 322—328.
- YAMASAKI M., YANO H., AOKI K., 1992: Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: III Effect of sodium dodecyl sulphate. *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**: 305—312.
- YANG A.S., HONIG B., 1993: On the pH dependence of protein stability. *J. Mol. Biol.*, **231**: 459—474.
- YANG F., JR G.N.P., 1996: Crystal structures of CO-, Deoxy- and Met-myoglobins at various pH values. *J. Mol. Biol.*, **256**: 762—774.
- YANG Z., YANG L., ZHANG Y., YU H., AN W., 2007: Effect of heat and pH denaturation on the structure and conformation of recombinant human hepatic stimulator substance. *Protein J.*, **26**: 303—313.

- ZAVODNIK I.B., LAPSHINA YE A., 1997: Influence of the bulk dielectric properties of the medium on the stability of globula proteins and membranes. *Biophysics*, **42**: 1049—1053.
- ZHANG F., THOTTANANIYIL M., MARTIN D.L., CHEN C.H., 1999: Conformational alteration in serum albumin as a carrier for pyridoxal phosphate: A distinction from pyridoxal phosphate-dependent glutamate decarboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **364**: 195—202.
- ZIELENKIEWICZ A., 1998: The conformational changes of 5S_rRNA from lupin seeds and tRNA^{Phe} in presence of Ca²⁺, Mn²⁺ cations by DSC method. *J. Thermal. Anal.*, **54**: 227—236.
- ZIELENKIEWICZ A., ZIELENKIEWICZ W., 2005: Comparison of enthalpy and apparent molar volume data on nucleating lysozyme solution at various Li₂SO₄, MgCl₂ and (NH₄)₂SO₄ concentrations. *J. Mol. Liq.*, **121**: 3—7.
- ZIELENKIEWICZ A., 2007: Calorimetric and volumetric data of salting of albumin from human serum using NaCl solutions. *J. Thermal. Anal. Cal.*, **89**: 893—897.
- ZIELENKIEWICZ W., POZNAŃSKI J., 1998 a: Partial molar volumes of hydrophobic compounds — insight into the solvation shell. Part I. *J. Sol. Chem.*, **27**: 245—254.
- ZIELENKIEWICZ W., POZNAŃSKI J., ZIELENKIEWICZ A., 1998 b: Partial molar volumes of alkylated uracils — insight into the solvation shell. Part II. *J. Sol. Chem.*, **27**: 543—551.
- ZIELENKIEWICZ W., POZNAŃSKI J., 1999: Partial molar volumes — Insights into molecular structure. *J. Mol. Liquids*, **81**: 37—45.
- ZIELENKIEWICZ W., 2000: *Pomiary efektów cieplnych, metody i zastosowania*. Warszawa: Polska Akademia Nauk. Centrum Upowszechniania Nauki.
- ZIELENKIEWICZ W., 2003 a: Thermodynamic investigations on derivatives of pyrimidine nucleic acid bases. Joint use of calorimetric, volumetric and structural data for the description of properties of pyrimidine nucleic acid bases and their derivatives. *Thermochim. Acta*, **405**: 155—169.
- ZIELENKIEWICZ W., 2003 b: *Energetics of biomolecules. Thermochemical and calorimetric investigations, Thermodynamics for environment*. Warszawa: Information Processing Centre, s. 183—248.
- ZOTTI-MARTELLI L., PECCATORI M., MAGGINI V., BALLARDIN M., BARALE R., 2005: Individual responsiveness to induction of micronuclei in human lymphocytes after exposure *in vitro* to 1800 MHz microwave radiation. *Mutat. Res.*, **582**: 42—52.
- ZÚÑIGA A., MARQUÉS A., GABALDÓN M., 1997: Proinflammatory activity on rat carotid endothelium of albumins obtained by different procedures. *Thromb. Res.*, **86**: 243—254.
- ZUNSZAIN P.A., MONIE T., KONAREV P.V., SVERGUN D.V., CURRY S., 2003 a: Structural analysis of conformational changes in human serum albumin associated with ligand binding and pH. www.hasylab.desy.de/?science/annual_report/2003_report/part2/contrib./73/9952.pdf
- ZUNSZAIN P.A., GHUMAN J., KOMATSU T., TSUCHIDA E., CURRY S., 2003 b: Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct. Biol.*, **3**: 6—13.

Anna Michnik

Microcalorimetric study of albumin conformational changes induced by various physicochemical factors

S u m m a r y

Thermal unfolding of albumin in aqueous solutions proceeding under different physico-chemical conditions has been investigated using differential scanning calorimetry (DSC). The dependence of the observed conformational restructuring on the kind of albumin (human, bovine), its form (fatty acid free and nondefatted), the properties of solvent (water, ethanol solutions), ionic strength, pH, protein concentration and experimental conditions has been discussed in this work. The endothermic unfolding transition has been shown to be modified by time changes and changes induced by such environmental factors as radio frequency radiation or UV radiation.

Considering the process of albumin thermal unfolding within the equilibrium thermodynamics, a deconvolution of DSC traces have been performed using the appropriate mathematical models. Structurally independent subunits revealed during thermal denaturation of albumin has been found pH dependent. At pH range corresponding to the N form of albumin these subunits could be correlated with three albumin domains for human albumins and nondefatted bovine albumin. Under the same conditions two subunits have been revealed for fatty acid free bovine albumin: C-terminal fragment containing domain III and the greater part of domain II and the N-terminal fragment containing domain I and the smaller part of domain II.

DSC study of albumin in ethanol solutions has revealed stronger binding of ethanol to defatted than to nondefatted albumin. The interaction of ethanol with fatty acid binding sites located in subdomain IIA has been confirmed. Ethanol has been observed to be a stabilizer of the folded state of albumin at a lower concentration contrary to the high denaturant concentration where its binding to the unfolded protein predominates.

The obtained results indicate that the influence of radiofrequency radiation (from several to tens MHz) on albumin unfolding events could be detected using ultrasensitive microcalorimeter. That influence is not observed immediately, however, the differences between DSC profiles for irradiated and nonirradiated albumin solutions have appeared during their storage. The changes in irradiated samples outpace nonirradiated ones.

Calorimetric and spectroscopic results have shown the conformational restructuring of albumin under UV irradiation. The differences in response to UV radiation between nondefatted and fatty acid free albumins have been found. Albumin devoid of endoge-

nous fatty acids has been suggested to be more susceptible to aggregation caused by UV A—C as well as 254 nm UVC radiation. DSC curve deconvolution results allow to conclude that the *C*-terminal fragment of albumin macromolecule, containing domain III, is the most liable part to UV radiation.

The studies presented by the author have revealed the fundamental role of the presence of fatty acids for the thermal stability, conformational rearrangement and binding properties of albumin macromolecule.

Anna Michnik

**Mikrokalorimetrische Untersuchungen von Konformationsumwandlungen
des dem Einfluss von ausgewählten physikochemischen Faktoren ausgesetzten Albumins**

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Ergebnisse der Untersuchungen von strukturellen Umwandlungen des Albumins unter dem Einfluss der kontrollierten Temperaturzunahme in wässrigen Lösungen. Die thermische Entfaltung der dem Einfluss von verschiedenen physikochemischen Faktoren ausgesetzten menschlichen Albumine und Rindsalbumine wurde mit Hilfe der differentialen Scanningmikrokalorimetrie (DSC) untersucht. Man diskutierte die Abhängigkeit des genannten Prozesses von der Art des Albumins (menschliches Albumin, Rindsalbumin), dessen Struktur (fettsäurereiches Albumin, entfettetes Albumin), von der modifizierten Zusammensetzung und Eigenschaften des Lösungsmittels (Wasser, wässrige Äthanollösungen), dessen Ionenkraft, pH, von Eiweißkonzentration und von den Versuchsbedingungen. Es wurde festgestellt, dass der bei thermischer Entfaltung beobachtete endotherme Übergang von DSC spiegelt die in den untersuchten Eiweißlösungen mit der Zeit und unter dem Einfluss von äußeren Umweltfaktoren eingetretenen Änderungen wider.

Die thermische Entfaltung des Albumins der Gleichgewichtsthermodynamik gemäß untersuchend analysierte man die Funktion der Überschusswärmekapazität des Eiweißkörpers mit Hilfe der entsprechenden mathematischen Modelle. Es wurden die im Prozess der thermischen Denaturierens erscheinenden, strukturellen, von pH abhängenden Untereinheiten abgetrennt. Es wurde festgestellt, dass diese Untereinheiten in wässrigen Lösungen mit den dem N-Albumin entsprechenden pH-Werten mit drei Moleküldomänen des menschlichen Albumins und des nicht entfetteten Rindsalbumins korreliert werden können. Die Entfaltung des entfetteten Rindsalbumins verläuft in den Umständen mit der Aufteilung in zwei Untereinheiten: den die III. Domäne und den größten Teil der II. Domäne umfassenden C- Endteil, und den aus der I. Domäne und dem kleineren Teil der II. Domäne gebildeten N- Endteil.

Aus der Beobachtung von thermischen Charakteristiken des Albumins in wässrigen Äthanollösungen wurde geschlossen, dass sich das Äthanol besser mit entfettetem als mit nicht entfettetem Albumin verbindet. Die Vermutungen, dass das Äthanolmolekül die Verbindungsstellen der Fettsäure in der Subdomäne IIA einnimmt, haben sich bestätigt. Man stellte folgendes fest: die Struktur des Albumins wird durch kleine

Konzentrationen des Äthanol stabilisiert und durch hohe Konzentrationen des Äthanol destabilisiert, und die Eigenschaften der Bindung des Äthanol mit Albumin hängen von der Konzentration des Äthanol ab.

Dank der Anwendung von einem hochspezialisierten und hochempfindlichen Mikrokalorimeter wurde nachgewiesen, die RF-Strahlung mit der Frequenz von einigen MHz bis ein paar Dutzenden MHz beeinflusst die thermische Umwandlungen in wässrigen Albuminlösungen. Die Folgen der Einwirkung der Exposition auf die Strahlung werden nicht sofort beobachtet. Sie bestehen in der temporalen Beschleunigung von den im Eiweißkörper ablaufenden Umwandlungen.

Auf Grund der kalorimetrischen und spektroskopischen Untersuchungen UV VIS wurde festgestellt, dass die UV-Strahlung ein solcher Faktor ist, der im Stande ist, die normale Struktur aller untersuchten Albuminarten durch Modifizierung der Eiweißkonformation sehr deutlich zu verändern und die Eiweißaggregation zu verursachen. Nachgewiesen wurden auch unterschiedliche Reaktionen des fettsäurefreien Albumins und des fettsäurereichen Albumins auf die UV-Strahlung. Das erste von ihnen war viel empfindlicher sowohl gegen die UV-Strahlung in deren vollem Bereich A-C, als auch gegen die UVC-Strahlung mit der Wellenlänge von 254 nm. Es wurde daraus geschlossen, dass die an das Makromolekül des Albumins auf natürliche Weise angeschlossenen Fettsäuren eine Schutzfunktion ausüben und die Aggregation des Eiweißkörpers verhindern. Die Anpassungsparameter von DSC-Versuchskurven in entwickelten Modellen bestätigten unterschiedliche Reaktion der Albumine mit verschiedenem Gehalt der Fettsäure auf die UVC-Strahlung. Dank den Ergebnissen der Konvolutionsanalyse konnte man zum Schluss kommen, dass der C-Endteil des Albumins mit der Domäne II. in höchstem Grade der UV-Strahlung ausgesetzt ist.

Die durchgeführten Untersuchungen haben wesentliche Unterschiede im Verlauf der thermischen Entfaltung des freien und des fettsäurereichen Albumins aufgezeigt, indem sie kleinere thermische Beständigkeit des entfetteten Albumins bestätigt haben. Die mit der Fettsäureanlagerung verbundenen Konformationsumwandlungen verursachen eine unterschiedliche Reaktion der beiden Albuminarten auf die UV-Strahlung und unterschiedliche Äthanolbindungen.

Redakcja
GRAŻYNA WOJDAŁA

Redakcja techniczna
BARBARA ARENHÖVEL

Korekta
MIROSLAWA ŻŁOBIŃSKA

Copyright © 2009
by Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
Wszelkie prawa zastrzeżone

ISSN 0208-6336
ISBN 978-83-226-1840-0

Wydawca
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice
www.wydawnictwo.us.edu.pl
e-mail: wydawus@us.edu.pl

Wydanie I. Ark. druk. 9,0. Ark. wyd. 9,5.
Przekazano do łamania w styczniu 2009 r.
Podpisano do druku w lutym 2009 r.
Papier offset. kl. III, 90 g Cena 15 zł

Łamanie: Pracownia Składu Komputerowego
Wydawnictwa Uniwersytetu Śląskiego
Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek



Cena 15 zł

ISSN 0208-6336
ISBN 978-83-226-1840-0