

DIFFERENCIÁL SZKENING KALORIMETRIA (DSC) ÉS ALKALMAZÁSA A MEMBRÁN-KUTATÁSBAN

TÖLGYESI FERENC

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Budapest

A differenciál szkening kalorimetria (DSC) termoanalitikai módszer. A termoanalízis, az anyagok melegítés vagy hűtés alatti viselkedésének megfigyelése, szinte egyidős a civilizációval. Mégis, ha a termoanalízis mint tudományos módszer kifejlődését nézzük, elsősorban a francia Le Chatelier munkásságára kell gondolnunk, aki a múlt század vége felé ásványok vizsgálatával foglalkozva, készülékével először rögzített automatikusan termogramokat. Nem sokkal később Roberts-Austen ötletéből alakult ki a differenciáltermoanalízis (DTA), melynek elve a következő: programozottan melegített (v. hűtött) környezetbe helyezük a vizsgálandó és egy termikusan inert anyagot; ha a vizsgált anyagban (mintában) hőfelszabadulással vagy -elnyeléssel járó folyamat zajlik le, hőmérsékletkülönbség alakul ki a minta és az inert anyag között, melynek mérésével, ill. regisztrálásával a hőmérséklet vagy (időben lineáris fűtés esetén) az idő függvényében kapjuk a mintára jellemző termogramot. Ezekből a termogramokból először csak az átalakulások hőmérsékletét olvasták ki, de voltak próbálkozások az átalakulási hő (entalpia) megállapítására is az átalakulást jelző csúcs magasságából, ill. területéből. Ezek nagyon pontatlan eredményeket adtak.

A hatvanas években sorra születtek olyan készülékek, amelyek már pontosabb kalorimetriás mérésekre is használhatók voltak. Ezek a berendezések megtartották a DTA főbb sajátosságait, nevezetesen a differenciális elrendezést és a programozott fűtést, ill. hűtést. Változtatás a hőérzékelők elhelyezésében és a minta felé irányuló hőtranszport jobb szabályozása érdekében történt. Így születtek meg az ún. differenciál szkening kaloriméterek.

A DSC alkalmazási köre igen gyorsan szélesedik, ma már mind a fizikai, kémiai, mind a biológiai rendszerek vizsgálatában elismert a DSC által szolgáltatott adatok „jósa”.

A következőkben ismertetjük a mérési technikát, a DSC-görbék értékelésével nyerhető adatokat, kitérünk azok pontosságára. Röviden összefoglaljuk a módszer alkalmazási lehetőségeit, majd néhány példán keresztül illusztráljuk azokat az eredményeket, amelyeket a DSC alkalmazásával értek el a membrán-kutatásban.

Mérési technika

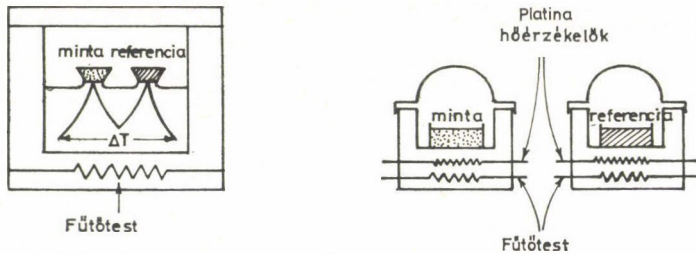
A DSC készülékeket működési elvük alapján két csoportba oszthatjuk (1. ábra):

— a mintát és a referenciaanyagot egyenletesen fűtve a két anyag hőmérsékletkülönbségét mérik (hőfluxus-mérő készülékek),

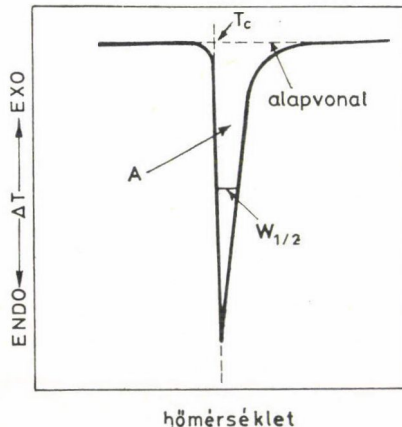
— a mintát és a referenciaanyagot külön-külön fűtve hőmérsékletüket mindig azonos értéken tartják és a két anyagba betáplált elektromos fűtőtelsítmény különbségét mérik (teljesítmény-kompenzációs készülékek).

Az előbbi elv alapján működnek a DuPont, Mettler, Linseis cégek készülékei, az utóbbira példa a Perkin-Elmer cég DSC-2 készüléke.

A mintatartó általában alumínium vagy, ha az alumíniummal kölcsönható anyagot vizsgálunk, aranyedényke. Folyékony minták számára hermetikusan lezárható edények készülnek, amelyek 2–3 atm belső nyomásnak is ellenállnak. A berendezés érzékenysége, felbontása növekszik azáltal, ha jó és minél nagyobb felületű az érintkezés a minta és a mintatartó között.



1. ábra. A DSC-készülékek két főbb típusának elvi felépítése: a) hőfluxus-mérő; b) teljesítmény-kompenzációs



2. ábra. Egy endoterm fázisátalakulás DSC-görbéje

A forgalomban levő készülékek általában a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $+700\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérséklettartományban használhatók különböző fűtési sebességek mellett.

Kvantitatív mérések előtt a készüléket kalibrálni kell valamely igen tiszta és ismert viselkedésű anyag segítségével. A leggyakrabban használt anyag az indium $\left(\text{olvadáspont } 156,4\text{ }^{\circ}\text{C}, \text{ olvadáshő } 28,4 \frac{\text{J}}{\text{g}}\right)$.

Egy DuPont-készülékkel endoterm fázisátalakulásról felvett termogramot láthatunk a 2. ábrán. A görbéből két alapvető adat olvasható le: az átalakulás hőmérséklete és entalpiája.

Az átalakulás hőmérsékletét inkább az ábra T_c pontja jellemzi, mint a csúcspont. A T_c pont az alapvonal és a csúcs felszálló ágára illesztett egyenes metszéspontja.

Itt kell megjegyeznünk, hogy az alapvonal átalakulás alatti részének megkonstruálása igen lényeges és nem egyszerű kérdés. Ha a minta hőkapacitása az átalakulás előtt és után közelítőleg megegyezik, azaz az alapvonal a csúcs előtt és után egy egyenesbe esik, akkor a 2. ábrán föltüntetett alapvonal jó közelítésnek vehető. Ha azonban a hőkapacitásváltozás jelentős, akkor a fönti közelítés már nem alkalmazható. Erre az esetre szóló elméletet dolgoztak ki BRENNAN és mtsai (1969) és HEUVEL és mtsa (1970).

Ha $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pontosságú adatokat szeretnénk kapni, akkor mindenképp előtt olyan kalibráló anyagot kell használni, amelynek átalakulási hőmérséklete közel esik a vizsgálandó átalakulási hőmérsékletéhez. Ezenkívül többek között az azonos és jól reprodukálható geometriai elrendezésre kell ügyelni és akkora tömegű mintát kell bemérni, hogy az elnyelt (v. keletkező) hő mindig közel azonos legyen. (PELLA és mtsa 1971).

Az átalakulási entalpia a görbe és az interpolált alapvonal által bezárt területtel (A) arányos.

A teljesítménykompenzáció elvén működő készülékekre

$$\Delta H = k \frac{r}{v} \frac{A}{m} \left[\frac{\text{mJ}}{\text{mg}} \right] \quad (1)$$

összefüggés vonatkozik, amennyiben a regisztrálás az idő függvényében történt. Az (1)-ben m a minta tömege (mg), r az érzékenység, (mW/cm), v a regisztrálás sebessége (cm/s), k kalibrálási állandó.

A hőmérsékletkülönbséget regisztráló készüléknél a

$$\frac{dH}{dt} = k'T \text{ (J/s)} \quad (2)$$

egyenletből indulunk ki, ahol $\frac{dH}{dt}$ — a mintában végbemenő folyamat során bekövetkező entalpiaváltozás sebessége, ΔT a mintatartó és a referenciatartó

közötti hőmérsékletkülönbség ($^{\circ}\text{C}$), k' arányossági tényező ($\text{J/s } ^{\circ}\text{C}$). (2)-nek az idő szerinti integrálásával az (1) egyenletet kapjuk, ahol k tartalmazza a k' tényezőt is.

A k meghatározása ismert átalakuláshőjű anyag (mint említettük pl. indium) segítségével történik. Figyelembe kell venni, hogy k értéke függ a fűtési sebességtől és a hőmérséklettől, ezért különböző fűtési sebességekre külön meg kell állapítani az értékét és olyan anyagot kell kalibrálás céljára felhasználni, amelynek átalakulási hőmérséklete közel esik a vizsgálandó átalakulás hőmérsékletéhez.

Igen gondos kalibrálással, a körülmények pontos reprodukálásával, a mintatartó edényke mindig azonos elhelyezésével 2–3% pontosságot érhetünk el az átalakulási entalpia meghatározásában.

A 2. ábrán föltüntetett $W_{1/2}$ paraméter a csúcs félértékszélességét jelenti. Ez az érték nem azonos azzal a hőmérséklettartománnyal, amelyre az átalakulás kiterjed, mégis a tapasztalatok szerint jól jellemzi azt.

A DSC-készülékek fahő igen egyszerű és pontos ($\sim 1\%$) mérésére is alkalmasak (O'NEILL 1966).

Alkalmazások

A DSC összes alkalmazási lehetőségeit számbavenni igen komoly vállalkozás lenne, ezért itt csak rövid és felsorolásszerű áttekintést próbálunk adni a legfontosabbnak tartott lehetőségekről.

A fázisátalakulások vizsgálatán belül a párolgáshő, szublimációs hő meghatározását említjük először, mint amely feladat néhány technikai probléma megoldását igényelte (BARRALL 1973). A folyadékkristályok mezofázisainak vizsgálatát azért említjük külön, mivel ezen vizsgálatok nagy érzékenységet, jó felbontást kívánnak meg a készüléktől.

A DSC-módszer olyan fizikai paraméterek mint pl. a hővezetőképesség, elektromos vezetőképesség, hőkibocsátóképesség mérésére is alkalmas.

Újabban olyan DSC-készülékek kerültek forgalomba, melyekben a minta különböző nyomásnak tehető ki, így a vizsgálatokat a nyomás függvényében lehet végezni (JOHNSON és mtsa 1970).

A van't Hoff-egyenletnek megfelelően egy anyag olvadáspontja a szennyezettség mértékétől függően lecsökken, így elegendően pontos hőmérséklet-adatokból a minta tisztaságának foka is megállapítható (MARTI 1972).

Kémiai reakciók tanulmányozása esetén a folyamat mechanizmusára, kinetikai paraméterekre nyerhetünk információt (ROGERS 1972).

A DSC-módszer számtalan és legkülönbözőbb ipari alkalmazásairól részletes áttekintést ad MACKENZIE (1970).

A DSC-módszer legújabb alkalmazási területe a biológia, ill. biofizika. A biológiai mintáknak az eddigieknél jóval összetettebb volta természetesen

megnehezíti a termogramok helyes értelmezését. A DSC-módszernek a membránkutatásban történő felhasználásával a következő pontban külön foglalkozunk.

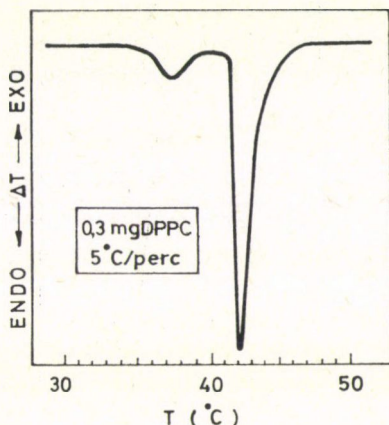
Alkalmazás a membrán-kutatásban

A biológiai membránok bonyolult és összetett működésének megértéséhez vezető egyik út szerkezetük felderítése.

A ma legkorszerűbb „fluid-mozaik”-modell (SINGER és mtsa 1972) szerint a membrán „csontváza” egy lipid kettősréteg, amelybe, ill. amelyhez fehérjék ágyazódnak, ill. kötődnek. A lipid kettősréteg fizikai állapotát tekintve folyadékkristály több, szerkezetben kissé különböző fázissal. A fázisok közötti átmenetek viszonylag kis energiájúak és igen érzékenyek a környezet változásaira.

E fázisátalakulások kalorimetriás vizsgálata értékes információkat adhat a membránok szerkezetére és azon keresztül működésükre vonatkozóan. Fel kell azonban hívnunk a figyelmet arra, hogy a DSC nem szerkezetvizsgáló módszer, az általa szolgáltatott adatok csak közvetve engednek bepillantást a szerkezetbe, így a termogramokból csak kellő óvatossággal lehet a következtetéseket levonni. Ezért a DSC-vel párhuzamosan közvetlen szerkezetvizsgáló módszereket, mint pl. a diffrakció, NMR, vagy ESR is célszerű alkalmazni.

A membrán fehérjéktől megszabadított lipid kettősrétege még mindig túl összetett volt ahhoz, hogy az első kalorimetriás vizsgálatokat ezen végezzék. Ezért egyetlen lipidfajtából, a DPPC*-ből készített modellmembrán volt a „nulladik közelítés” (CHAPMAN és mtsai 1967).

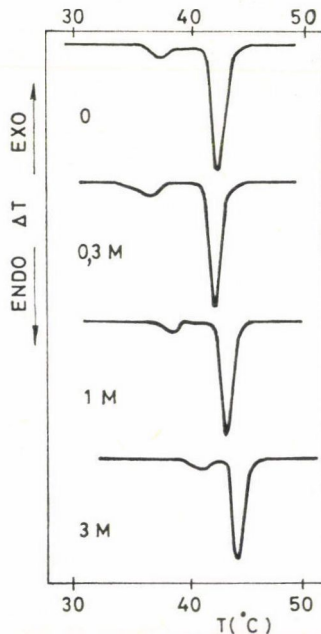


3. ábra. DPPC és víz 1 : 4 arányú keverékéről készült DSC-felvétel

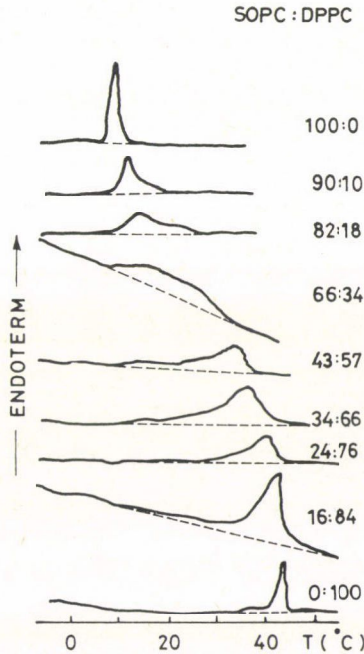
* DPPC = dipalmitoil-foszfátidilkolin

A 3. ábrán egy DPPC-víz diszperzióról készült DSC-felvétel látható. Két hőfelvétellel járó fázisátalakulás zajlik le 35 °C, ill. 41,5 °C-on. Egyéb vizsgálatokból tudjuk, hogy az első (pretransition) főként a lipidrétegek felszínében beálló változással, a második (main-transition) elsősorban a lipid-molekula szénhidrogénláncainak konformációváltozásával kapcsolatos (JANIÁK és mtsai 1976). Többszöri mérés esetén ha a második mérés gyorsan követi az elsőt, a pretransition alakja nem egyezik meg az első mérésben kapottal. A következő méréssel hosszabb ideig várva a pretransition visszanyeri eredeti alakját. A 41,5 °C-on történő fázisátalakulásnál ilyen eltérést a görbe alakjában nem tapasztalhatunk. Ez arra mutat, hogy a pretransition lassúbb relaxációjú folyamat, mint a másik. Hűtés közben is vizsgálva a minta viselkedését, a pretransition jelentős hiszterézist mutat, amiből az átalakulás kinetikájára vonhatunk le következtetéseket (CHO és mtsai 1981). Újabb eredmények szerint a DPPC-víz rendszernek még egy fázisátalakulása van +18 °C-on, amely még lassúbb relaxációjú, mint a 35 °C-on bekövetkező (FÜLDNER 1981).

A gyorsan bővülő vizsgálatok során a különböző hosszúságú telített szénhidrogénnel rendelkező foszfatidilkolinok (LADBROOKE és mtsai 1969, SILVIUS és mtsai 1979), majd más foszfolipidek, a foszfatidiletanolamin, a töltéssel rendelkező foszfatidilszerin (MCDONALD és mtsai 1976), foszfatidilgli-



4. ábra. SPC—DPPC különböző arányú keverékeiről készült DSC-görbék (SPC—1-sztearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-foszfokolin) (DAVIS és mtsai 1980)



5. ábra. DPPC—RbCl-oldat diszperzióról készült DSC-felvételek változó Rb-koncentráció mellett

cerol, foszfatidsav (JACOBSON és mtsai 1975) által alkotott modell-membránok kerültek sorra. Később olyan lipideket is vizsgáltak, ahol a kolin fejcsoport-hoz két különböző hosszúságú telített vagy telítetlen szénhidrogénlánc kapcsolódik (MASON és mtsai 1981, CHEN és mtsai 1981).

Elegendő információ és tapasztalat gyűjtése után már a kétkomponensű modellmembránok termogramjai is értékelhetőek voltak. LADBROOKE és mtsai (1968) DPPC és koleszterin keverékét, CHAPMAN és mtsai (1974) különböző lánchosszúságú foszfatidilkolin lipidek keverékét, MABREY és mtsai (1976), később STEWART és mtsai (1979) különböző fejcsoportú foszfolipidek keverékét vizsgálták.

A kalorimetriás mérésekből megszerkeszthető a keverékek fázisdiagramja, amelyből a különböző lipidmolekulák keveredésére, a fázisok koegzisztenciájára, a fázisszeparációra vonatkozóan vonhatunk le következtetéseket.

A biológiai membránok felé közelítést a telítetlen szénhidrogénlánccal rendelkező lipidekkel való foglalkozás is jelzi (PHILLIPS és mtsai 1970, FURUYA és mtsai 1979, DAVIS és mtsai 1980) (4. ábra).

Nemcsak a modellmembrán összetétele, hanem annak környezete, geometriája is befolyásolja az átalakulásokat. Töltéssel rendelkező fejcsoportú foszfolipideknél a pH értéke jelentős tényező (VAN DIJCK és mtsai 1978a,

BLUME és mtsai 1979). VAN DIJCK és mtsai (1978b) vizsgálták azt is, hogyan függ egyes foszfolipid liposzómák fázisátalakulása a liposzómák nagyságától és így görbületétől.

Mivel a biológiai membránok mindig ionos környezetben vannak, ezért érthető, hogy a modellmembránok és ionok kölcsönhatása is sok tanulmány tárgyát képezte már (SIMON és mtsai 1975, HARLOS és mtsai 1980).

Az 5. ábrán saját méréseink alapján azt mutatjuk be, hogy RbCl jelenléte hogyan változtatja meg a DPPC fázisátalakulásait. Növekvő Rb-koncentrációval mindkét fázisátalakulás egyre magasabb hőmérsékletre tolódik, miközben az átalakulások entalpiája csökken.

Sok gyógyszer (pl. antibiotikum és anesztetikum) hatása a membránnal való kölcsönhatásban jelentkezik. Ebből a szempontból érdekes ezen anyagoknak a modellmembrán fázisviszonyaira gyakorolt hatását figyelni. Anesztetikumok vizsgálatával foglalkoztak például HILL (1974), JAIN és mtsai (1975), LEE (1976), MACDONALD (1978), MOUNTCASTLE és mtsai (1978). BACH és mtsai (1976) hasisvegyületeknek a DPPC átalakulásaira gyakorolt hatását vizsgálták és megállapították, hogy mindkét fázisátalakulás hőmérséklete és entalpiája csökken. A pretransition már elég kis módosító anyag koncentrációnál eltűnik, nagy koncentrációnál pedig a main-transition két csúcsra válik szét, ami fázisseparatorációra utal.

BLUME (1979) dioxán és különböző foszfolipidek kölcsönhatásának tanulmányozása során azt az eredményt kapta, hogy a dioxán mindhárom foszfolipid (DPPC, DMPE, DMPA*) modellmembrán fázisátalakulási hőmérsékletét csökkentette, de különböző mértékben. A különbség abból ered, hogy a poláris dioxán és a foszfolipidek poláris fejcsoportja közötti kölcsönhatás függ a fejcsoportok hidratációjától. A DPPC fejcsoportja a legerősebben hidratált, és ennél a modellmembránnál volt a legkisebb a hatás.

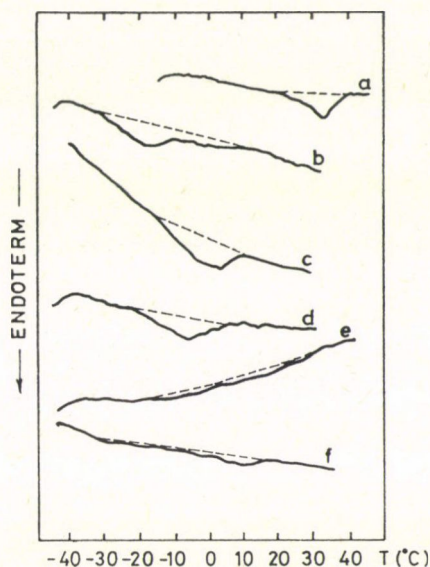
A membrán és gyógyszerek kölcsönhatását modellezték egyszerűbb rendszerrel egyes szerzők, amikor alkoholoknak a fázisátalakulásra gyakorolt hatását vizsgálták (ELIASZ és mtsai 1976, PRINGLE és mtsai 1979). Méréseik szerint DPPC-modellmembrán esetén az alacsony (≤ 10) szénatomszámú alkoholok csökkentik, amíg a nagy (≥ 12) szénatomszámúak növelik a fázisátalakulási hőmérsékletet. Azt a következtetést vonják le, hogy ha az alkohol hossza és konfigurációja hasonló a membránt alkotó molekulához, a perturbáció a legkisebb, míg ha eltér, akkor a fázisátalakulásra gyakorolt hatás nő. Hasonló jellegű eredményeket kaptak egyes nemionos felületaktív anyagokkal SZŐGYI és mtsai (1981).

Ha korábban úgy fogalmaztunk, hogy a membrán „csontváza” a lipid kettősréteg, akkor azt kell mondanunk, hogy minden egyebet a kettősrétegbe

* DMPE = dimirisztoil-foszfátidiletanolamin
DMPA = dimirisztoil-foszfátidsav

beépülő fehérjék jelentenek. Az út a biológiai membránok felé tehát a fehérjéknek a modellmembránokba való beépítésén keresztül vezet (PAPAHADJOPOULOS és mtsai 1975, BOGGS és mtsai 1980, EPAND és mtsai 1981). A különböző fehérjéknek lipid modellmembránhoz való hozzáadásával kapott DSC-termogramok alapján a protein—modellmembrán kölcsönhatást három csoportba osztották. Ha a fázisátalakulás entalpiája és kis mértékben a hőmérséklete nőtt (ribonukleáz és polilizin esetében) arra következtettek, hogy a protein a lipidréteg felszínén kötődött, anélkül, hogy a szénhidrogénláncok közé behatolna. Citokróm C és A hozzáadásával jelentősen csökkent az átalakulás hőmérséklete és entalpiája, ami arra utal, hogy a protein a felszínhez való kötődést követően jelentős deformációt okozott a lipid kettősrétegben. A harmadik csoportnál (pl. apoprotein, gramicidin A), ahol a fázisátalakulási hőmérséklet nem változott, viszont az entalpia a koncentráció növelésével egyenes arányban csökkent, a protein feltételezhetően beágyazódott a lipid szénhidrogénláncjai közé és a környezetben levő lipidekkel lépett kölcsönhatásba.

CHAPMAN óta a modellmembránok vizsgálata révén összegyűlt nagy ismeretanyag, mintegy „háttérként”, lehetővé tette az összetett biológiai rendszerek hatásosabb kalorimetriás tanulmányozását is. A főntebb vázlatosan ismertetett kutatások mellett a biológiai membránok vizsgálatában is egyre nagyobb szerepet kap a DSC-módszer.



6. ábra. Humán vörösvérsejt membránjának lipid frakcióiról készült DSC-termogramok a) szfingomielin; b) lecitin; c) foszfatidiletanolamin; d) foszfatidilszerin; e) a membrán külső oldalát modellező keverék (44 mol % szfingomielin, 44 mol % lecitin és 11,5 mol % foszfatidiletanolamin); f) a membrán belső oldalát modellező keverék (10 mol % szfingomielin, 14 mol % lecitin, 48 mol % foszfatidiletanolamin, 28 mol % foszfatidilszerin) (VAN DIJK és mtsai 1976)

A legnagyobb érdeklődés talán a vörösvérsejt membrán felé fordult. VAN DIJCK és mtsai (1976) humán vörösvérsejt membránjának foszfolipid frakcióit külön-külön és keverékükben is tanulmányozták. A 6. ábrán látható, hogy a membrán külső (e) és belső (f) oldalának lipidösszetételéhez hasonló keverékek széles, kevésbé kooperatív átalakulást mutatnak. Az is látható, hogy a külső oldal átalakulási görbéje kissé magasabb hőmérséklettartományban van, ami a külső oldal kisebb fluiditását jelenti.

A teljes vörösvérsejt membránnal foglalkoznak a következő munkák: JACKSON és mtsai (1973), BRANDTS és mtsai (1977), BRANDTS és mtsai (1978). Az alapos DSC-vizsgálatok szerint a vörösvérsejt membránnak négy endotherm átalakulása (A, B, C, D) van az 50–80 °C hőmérséklettartományban. A legalacsonyabb és legmagasabb hőmérsékleten jelentkező csúcsok (A és D) a fehérjék kicsavarodásával kapcsolatosak, amint azt egyéb pl. cirkuláris dikroizmus vizsgálatok is megerősítik. Egyes jelek (pl. a foszfolipáz A₂ hatására bekövetkező változás a C csúcsban) arra utalnak, hogy a C átalakulásban a membrán foszfolipidjeinek is szerepe van. A B csúcs igen összetett kölcsönhatások eredőjeként jön létre, a mérések szerint kialakulásában mind protein—protein, mind protein—lipid ill. lipid—lipid kölcsönhatás szerepet játszik.

SNOW és mtsai (1981) a humán vörösvérsejt membrán DSC-módszerrel észlelhető szerkezeti változásai és a membrán anion transzportja közötti kapcsolatot vizsgálták. Eredményeik közül megemlíttjük, hogy a C fázisátalakulásnak (amelyben a lipidek szerepe jelentős) termikus vagy enzimátikus úton való részleges megszüntetése egyben az anion-transzport részleges gátlását is jelentette.

LYSKO és mtsai (1981) a vörösvérsejt membránban melegítés hatására bekövetkező protein aggregációval foglalkoznak, amelynek tanulmányozására egy új módszert az ún. termikus gél analízist fejlesztették ki.

A DSC-módszer, történetének közel két évtizede alatt, nagyon sokat fejlődött, ami a készülékek érzékenységét, felbontását és pontosságát illeti. Ezzel is magyarázható a módszernek az a lendületes térnyerése, amelyet a röntni rövid és hézagos áttekintésünkkel talán sikerült érzékeltetni. Ez a térnyerés tovább folytatódhat, ha a mérések igen gondos kivitelezésének szükségességét és a módszer korlátait szem előtt tartjuk.

IRODALOM

- BACH, D., A. RAZ, R. GOLDMAN *Biochim. Biophys. Acta* **436**, 889–894 (1976).
 BARRAL, E. M. *Thermochim. Acta* **5**, 377 (1973).
 BLUME, A., H. EIBL: *B. B. A.* **558**, 13–21 (1979).
 BLUME, A.: *Biophys. Chemistry* **10**, 371–387 (1979).
 BOGGS, J. M., R. CLEMENT, M. A. MOSCARELLO: *B. B. A.* **601**, 134–151 (1980).
 BRANDTS, J. F., R. D. TAVERNA, E. SADARIVAN, K. A. LYSKO: *B. B. A.* **512**, 566–578 (1978).
 BRANNTS, J. F., L. ERICKSON, K. LYSKO, A. T. SCHWARTZ, R. D. TAVERNA: *Biochemistry* **16**, 3450–3454 (1977).

- BRENNAN, W. P., MILLER, B., WHITWELL, J. C.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **8**, 314 (1969).
CHAPMAN, D., J. URBINA, K. M. KEOUGH: *J. Biol. Chem.* **249**, 2512–2521 (1974).
CHAPMAN, D., R. M. WILLIAMS, B. O. LANBROOKE: *Chem. Phys. Lipids* **1**, 445–475 (1967).
CHEN, S. C., J. M. STURTEVANT: *Biochemistry* **20**, 713–718 (1981).
CHO, K. C., C. L. CHOY, K. YOUNG: *B. B. A.* **663**, 14–21 (1981).
DAVIS, P. I., K. P. COOLBEAR, K. M. W. KEOUGH: *Can. J. Biochem.* **58**, 851–858 (1980).
VAN DIJCK, P. W. M., E. I. I. VAN ZOELLEN, R. SELNENRIJK, L. L. M. VAN DEENEN, I. DE GIER: *Chem. Phys. Lipids* **17**, 336–343 (1976).
VAN DIJCK, P. W. M., B. DE KRUIJFF, B. VERKLEIJ, A. J. VAN DEENEN, I. DE GIER: *B. B. A.* **512**, 84–96 (1978a).
VAN DIJCK, P. W. M., B. DE KRUIJFF, P. A. M. M. AARTS, A. J. VERKLEIJ, I. DE GIER: *B. B. A.* **506**, 183–191 (1978b).
ELIASZ, A. W., D. CHAPMAN, D. F. EWING: *B. B. A.* **448**, 220–230 (1976).
EPAND, R. M., J. M. STURTEVANT: *Biochemistry* **20**, 4603–4606 (1981).
FURUYA, K., T. MITSUI: *J. Phys. Soc. Japan* **46**, 611–616 (1979).
FÜLDNER, H. H.: *Biochemistry* **20**, 5707–5710 (1981).
HARLOS, K., H. EIBL: *B. B. A.* **601**, 113–122 (1980).
HEUVEL, H. M., K. C. J. B. LIND: *Anal. Chem.* **42**, 1044 (1970).
HILL, M. W.: *B. B. A.* **356**, 117 (1974).
JACKSON, W. J., J. KOSTYLA, J. NORDIN, J. F. BRANDTS: *Biochemistry* **12**, 3662 (1973).
JACOBSON, K., D. PAPAHAJDOPOULOS: *Biochemistry* **14**, 152–161 (1975).
JAIN, M. K., M. Y. WU, L. V. WRAY: *Nature* **255**, 494 (1975).
JANIÁK, M. J., D. M. SMALL, G. G. SHIPLEY: *Biochemistry* **15**, 4575–4580 (1976).
JOHNSON, J. F., G. W. MILLER: *Thermochim. Acta* **1**, 373 (1970).
LADBROOKE, B. D., R. M. WILLIAMS, D. CHAPMAN: *B. B. A.* **150**, 333 (1968).
LADBROOKE, B. D., D. CHAPMAN: *Chem. Phys. Lipids* **3**, 304–367 (1969).
LEE, A. G.: *Biochemistry* **15**, 2448 (1976).
LYSKO, K. A., R. CARLSON, R. TAVERNA, J. SNOW, J. F. BRANDTS: *Biochemistry* **20**, 5570–5576 (1981).
MABREY, S., J. M. STURTEVANT: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **73**, 3862–3866 (1976).
MACKENZIE, R. C.: *Differential Thermal Analysis*, Vol. 1, (London: Academic Press) (1970).
MARTI, E. E.: *Thermochim. Acta* **5**, 173 (1972).
MASON, J. F., C. HUANG, R. L. BILTONEN: *Biochemistry* **20**, 6086–6092 (1981).
MC DONALD, R. C., S. A. SIMON, E. BEAR: *Biochemistry* **15**, 885–891 (1976).
MC DONALD, A. G.: *B. B. A.* **507**, 26 (1978).
MOUNTCASTLE, D. B., R. L. BILTONEN, J. HALSEY: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **75**, 4906–4910 (1978).
O'NEILL, M. J.: *Anal. Chem.* **38**, 1331 (1966).
PAPAHAJDOPOULOS, D., M. MOSCARELLO, E. H. EYLAR, T. ISAC: *B. B. A.* **401**, 317 (1975).
PELLA, E., NEBULONI, M.: *J. Thermal. Anal.* **3**, 229 (1971).
PHILLIPS, M. C., B. D. LADBROOKE, D. CHAPMAN: *B. B. A.* **196**, 35 (1970).
PRINGLE, M. J., K. W. MILLER: *Biochemistry* **15**, 3314–3320 (1979).
ROGERS, R. N.: *Thermochim. Acta* **3**, 437 (1972).
SILVIUS, J. R., B. D. READ, R. N. McELHANA: *B. B. A.* **555**, 175–178 (1979).
SINGER, S. J., G. L. NICHOLSON: *Science* **175**, 720–731 (1972).
SNOW, J. W., J. VINCENTELLI, J. F. BRANDTS: *B. B. A.* **642**, 418–428 (1981).
STEWART, T. P., S. W. HUI, A. R. PORTIS, D. PAPAHAJDOPOULOS: *B. B. A.* **556**, 1–16 (1979).
SIMON, S. A., L. J. LIS, J. W. KAUFFMAN, R. C. MACDONALD: *B. B. A.* **375**, 317–326 (1975).
SZÓGYI, M., CSERHÁTI T., SZABON J.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **24**, 201–207 (1981).