

УДК 577.322.037

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА НЕОБРАТИМОЙ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКА ПРИ ПЕРЕМЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ. I. МОДЕЛЬ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ДВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО ПРОТЕКАЮЩИЕ НЕОБРАТИМЫЕ СТАДИИ

© 1998 г. А.Е. Любарев*, Б.И. Курганов

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН,

117071 Москва, Ленинский просп., 33; факс: (095)954-2732, электронная почта: inbio@glas.apc.org

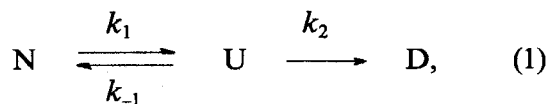
Поступила в редакцию 13.11.97

Проведен теоретический анализ модели тепловой денатурации белка, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии. Получено уравнение, описывающее зависимость избыточной теплоемкости (C_p^{ex}) от температуры (T) при постоянной скорости изменения температуры (скорости сканирования). Это уравнение использовано для построения теоретических кривых зависимости C_p^{ex} от T . Исследовано изменение формы теоретических кривых при варьировании параметров уравнения Аррениуса, соотношения энтальпий денатурации для первой и второй стадий, а также скорости сканирования. Показано, что формальное использование одностадийной модели в случае денатурации белка, которая протекает по механизму, включающему две последовательно протекающие необратимые стадии, не позволяет получить адекватную информацию о кинетических характеристиках процесса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: денатурация белка, дифференциальная сканирующая калориметрия, уравнение Аррениуса.

Для изучения тепловой денатурации широко используется метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Математический анализ получаемых этим методом зависимостей теплоемкости белка (C_p) от температуры (T) позволяет определить термодинамические и кинетические характеристики процесса денатурации [1–4].

Принято считать, что денатурация белка может быть описана моделью Ламри–Эйринга [5], включающей последовательно протекающие одну обратимую и одну необратимую стадии:

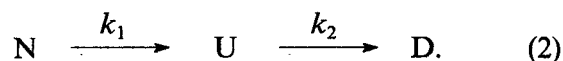


N , U и D – нативное, частично развернутое и денатурированное состояния белка, k_1 , k_{-1} и k_2 – константы скорости соответствующих реакций. Однако использование полной модели Ламри–Эйринга для количественного описания зависимостей C_p от T затруднено, так как используемая в этом случае система дифференциальных уравнений при изменяющейся температуре не имеет аналитического решения. Поэтому пред-

ставляется целесообразной разработка более простых математических моделей, являющихся частными случаями полной модели Ламри–Эйринга.

В ряде работ для анализа кривых ДСК применялась модель, включающая одну необратимую стадию [6–14]. Однако проведенный нами анализ показал, что тепловая денатурация некоторых белков, которая ранее была описана в рамках одностадийной модели, не вполне удовлетворяет данному механизму [15].

В настоящей работе анализируется модель денатурации белка, включающая две последовательно протекающие необратимые стадии:



Эту модель можно считать частным случаем модели Ламри–Эйринга, реализующимся для ситуации, когда скорость обратной реакции на первой стадии мала по сравнению со скоростью второй стадии. В литературе отсутствует анализ кривых ДСК, удовлетворяющих данному механизму. Наши предварительные расчеты показывают, что данная модель позволяет удовлетворительно описать процесс тепловой денатура-

*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

ции некоторых белков. В частности, с помощью этой модели нами была описана тепловая денатурация уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* [16].

МОДЕЛЬ

Кинетическое поведение системы, описываемой моделью (2), определяется системой дифференциальных уравнений

$$\begin{cases} \frac{d\gamma_N}{dt} = -k_1\gamma_N \\ \frac{d\gamma_U}{dt} = k_1\gamma_N - k_2\gamma_U \end{cases} \quad (3)$$

где γ_N и γ_U – соответственно молярная доля нативного и частично развернутого белка. При постоянной скорости сканирования $v = dT/dt$ (T – абсолютная температура, t – время) система уравнений (3) преобразуется в систему

$$\begin{cases} \frac{d\gamma_N}{dT} = -\frac{1}{v} k_1\gamma_N \\ \frac{d\gamma_U}{dT} = \frac{1}{v} (k_1\gamma_N - k_2\gamma_U) \end{cases} \quad (4)$$

Первое уравнение системы (4) решается так же, как и в случае одностадийной модели [15]. Следовательно,

$$\gamma_N = \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_1 dT\right) \quad (5)$$

Подставляя выражение γ_N из уравнения (5) во второе уравнение системы (4), получаем:

$$\frac{d\gamma_U}{dT} + \frac{k_2}{v} \gamma_U = \frac{k_1}{v} \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_1 dT\right) \quad (6)$$

Уравнение (6) является линейным. Решая его и учитывая, что $\gamma_U = 0$ при $T = T_0$, получаем:

$$\gamma_U = \frac{1}{v} \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_2 dT\right) \int_{T_0}^T k_1 \exp\left(\frac{1}{v} \int_{T_0}^T (k_2 - k_1) dT\right) dT \quad (7)$$

Избыточное изменение энтальпии реакции (ΔH) складывается из избыточных изменений энтальпии обеих стадий и равно

$$\langle \Delta H \rangle = \Delta H_1(1 - \gamma_N) + \Delta H_2(1 - \gamma_N - \gamma_U) \quad (8)$$

где ΔH_1 и ΔH_2 – молярные изменения энтальпии для первой и второй стадии. Избыточная теплоемкость с учетом системы уравнений (4) выражается уравнением

$$C_p^{ex} = \frac{d\langle \Delta H \rangle}{dT} = \frac{\Delta H_1 k_1}{v} \gamma_N + \frac{\Delta H_2 k_2}{v} \gamma_U \quad (9)$$

Подставляя в уравнение (9) выражения γ_N из уравнения (5) и γ_U из уравнения (7), получаем:

$$C_p^{ex} = \frac{\Delta H_1 k_1}{v} \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_1 dT\right) + \frac{\Delta H_2 k_2}{v^2} \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_2 dT\right) \int_{T_0}^T k_1 \exp\left(\frac{1}{v} \int_{T_0}^T (k_2 - k_1) dT\right) dT \quad (10)$$

ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ УРАВНЕНИЯ АРРЕНИУСА НА ФОРМУ КРИВЫХ ЗАВИСИМОСТИ ИЗБЫТОЧНОЙ ТЕПЛОЕМКОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Согласно уравнению Аррениуса зависимость константы скорости (k) от температуры подчиняется экспоненциальному закону $k = A \exp(-E_a / RT)$, где A – предэкспоненциальный множитель, E_a – энергия активации, R – газовая постоянная. Удобнее пользоваться другой формой уравнения Аррениуса, где вместо параметра A используется параметр T^* :

$$k = \exp\left(\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad (11)$$

В отличие от A параметр T^* имеет ясный физический смысл – это температура, при которой константа скорости равна 1 мин^{-1} .

Таким образом, зависимость избыточной теплоемкости C_p^{ex} от температуры определяется скоростью сканирования v и шестью параметрами процесса денатурации: энтальпией, энергией активации и параметром T^* для каждой стадии.

Как видно из уравнений (9) и (10), значение избыточной теплоемкости является суммой двух слагаемых, соответствующих двум стадиям процесса. Поэтому профиль зависимости C_p^{ex} от T можно разложить на две составляющие. Первое слагаемое в уравнении (10) аналогично выражению для избыточной теплоемкости, полученному для одностадийной модели [15]. Его величина определяется скоростью сканирования и

тремя параметрами первой стадии, причем ΔH определяет площадь под кривой, E_a – форму пика (чем больше значение E_a , тем уже пик), а T^* и ν в основном отвечают за положение точки максимума.

Второе слагаемое в уравнении (10), соответствующее второй стадии процесса, зависит от параметров не только этой, но и первой стадии

(кроме ΔH_1). Это понятно, так как скорость второй стадии определяется не только константой скорости для этой стадии, но и концентрацией формы U, образующейся на первой стадии.

В качестве примера на рис. 1 приведены разложенные на составляющие профили зависимости C_p^{ex} от T (а, в, д) и соответствующие кривые изменения долей форм N, U и D (б, г, е) для раз-

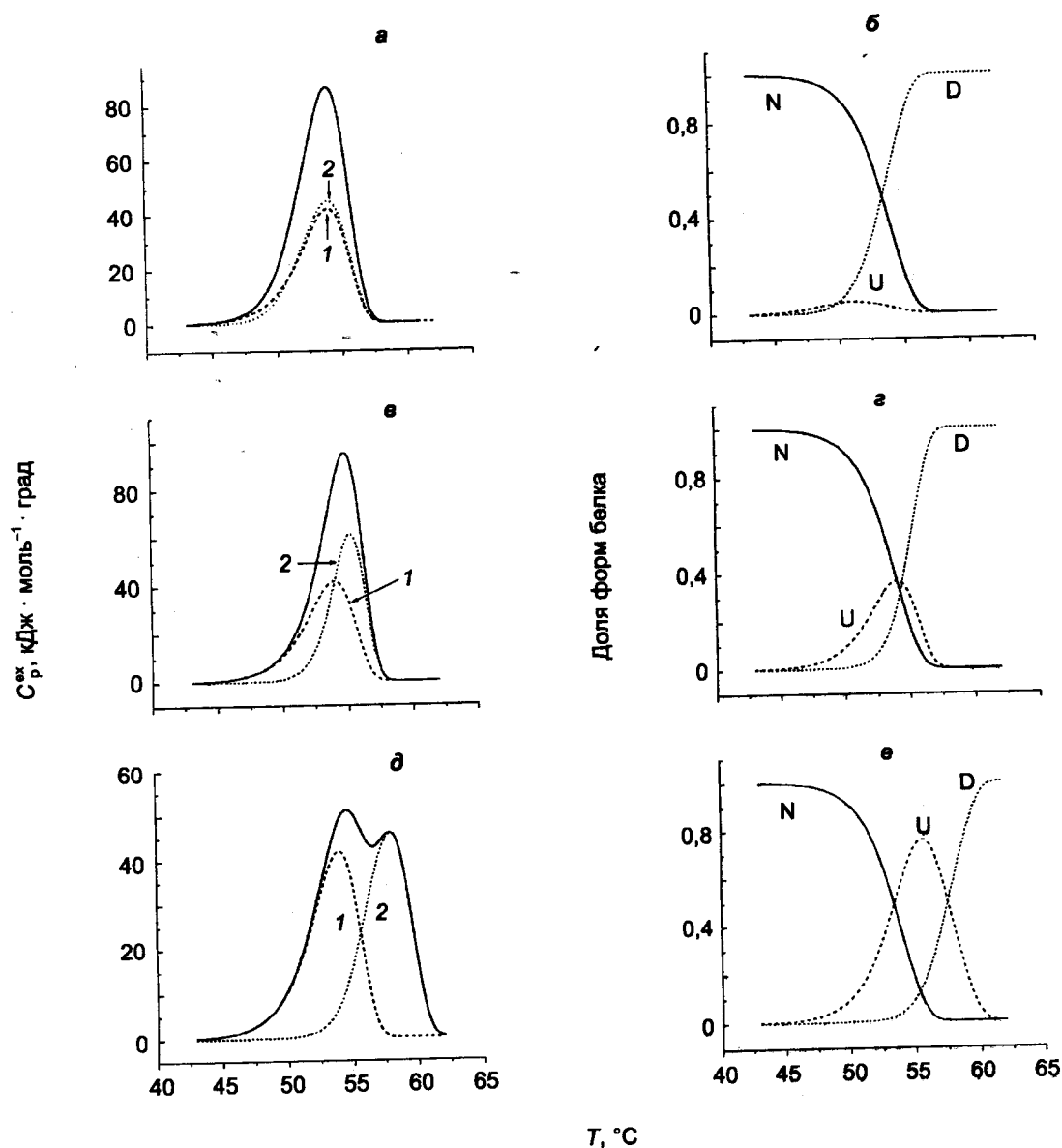


Рис. 1. Температурный профиль суммарной избыточной теплоемкости (C_p^{ex}) (сплошная линия) и ее составляющих (штриховая линия – избыточная теплоемкость первой стадии, пунктир – второй стадии) (а, в, д) и соответствующие кривые изменения доли форм N (нативная), U (частично развернутая) и D (денатурированная) (б, г, е). Для всех кривых $E_{a,1} = E_{a,2} = 500$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 = \Delta H_2 = 200$ кДж · моль⁻¹, $T^*_1 = 328,16$ К (55°), $\nu = 1$ град · мин⁻¹. Значения T^*_2 : 323,16 (а, б), 328,16 (в, г), 332,16 К (д, е)

ных значений параметров процесса. Видно, что в том случае, когда $k_2 \gg k_1$ ($T_1^* > T_2^*$, $E_{a,1} = E_{a,2}$), первая стадия является лимитирующей, значительного накопления интермедиата U не происходит (б), и обе составляющие кривые имеют максимумы при примерно одной и той же температуре (а).

В том случае, когда константы скорости для обеих стадий равны ($E_{a,1} = E_{a,2}$, $T_1^* = T_2^*$), на начальном участке кривой зависимости C_p^{ex} от T скорость первой стадии значительно превышает скорость второй, и доля интермедиата U растет. После того, как значение γ_U сравняется со значением γ_N , скорость второй стадии становится больше и доля формы U начинает снижаться (з). В результате составляющая зависимости C_p^{ex} от T , соответствующая второй стадии, оказывается сдвинутой относительно составляющей, соответствующей первой стадии, в сторону более высоких температур. Однако этот сдвиг небольшой, поэтому результирующая кривая выглядит как один пик, но с ярко выраженной асимметрией (б).

В том случае, когда $k_1 > k_2$ ($T_2^* > T_1^*$, $E_{a,1} = E_{a,2}$), происходит значительное накопление интермедиата U (е), и профиль зависимости C_p^{ex} от T становится двугорбым (д). Таким образом, изменение одного параметра (T_1^* или T_2^*) приводит к существенным вариациям формы кривой ДСК.

В тех случаях, когда $E_{a,1} \neq E_{a,2}$, ситуация может быть более сложной. При $E_{a,1} > E_{a,2}$ при относительно низких температурах выполняется неравенство $k_2 > k_1$. При определенной температуре происходит инверсия (если $T_1^* = T_2^*$, то температура инверсии совпадает с этим значением) и k_1 становится больше, чем k_2 . В результате профиль зависимости C_p^{ex} от T становится более симметричным (рис. 2, а, кривая, соответствующая $E_{a,2} = 100$ кДж · моль⁻¹).

При $E_{a,1} < E_{a,2}$ при относительно низких температурах $k_1 > k_2$, а после точки инверсии — имеет место обратная ситуация: $k_2 > k_1$; поэтому профиль зависимости C_p^{ex} от T становится резко асимметричным (рис. 2, а, кривая, соответствующая $E_{a,2} = 1000$ кДж · моль⁻¹). Если за показатель симметрии взять отношение теплоты, поглощенной до достижения точки максимума, к теплоте, поглощенной после этой точки (т.е. отношение площадей левой и правой частей пика), то для кривых, представленных на рис. 2, а, это отношение составит: 1,49 ($E_{a,2} = 100$ кДж · моль⁻¹), 1,75 ($E_{a,2} = 500$ кДж · моль⁻¹) и 2,39 ($E_{a,2} = 1000$ кДж · моль⁻¹).

Если $T_2^* > T_1^*$, то точка инверсии смещается в сторону более низких температур при $E_{a,1} > E_{a,2}$ и в сторону более высоких температур при $E_{a,1} < E_{a,2}$. Как видно из рис. 2, б, это приводит к

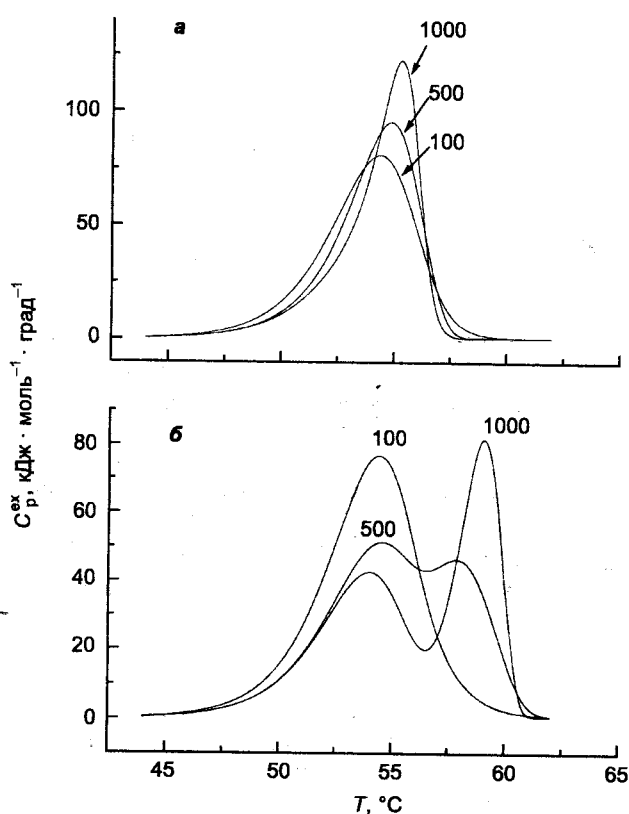


Рис. 2. Температурные профили избыточной теплоемкости при различных соотношениях значений параметров уравнения Аррениуса для первой и второй стадий. Для всех кривых $E_{a,1} = 500$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 = \Delta H_2 = 200$ кДж · моль⁻¹, $T_1^* = 328,16$ К (55°), $v = 1$ град · мин⁻¹. Значения T_2^* : 328,16 (а), 332,16 К (б). Значения $E_{a,2}$ указаны над кривыми

большому разнообразию форм кривых. Если при $E_{a,2} = 100$ кДж · моль⁻¹ получается достаточно симметричный пик (отношение площадей левой и правой частей составляет 1,33), то при $E_{a,2} = 500$ кДж · моль⁻¹, видны два пика, а при $E_{a,2} = 1000$ кДж · моль⁻¹ пики четко разделяются, при этом второй пик становится значительно выше и уже первого.

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ ЭНТАЛЬПИЙ ДЕНАТУРАЦИИ ДЛЯ ПЕРВОЙ И ВТОРОЙ СТАДИЙ НА ФОРМУ КРИВЫХ ЗАВИСИМОСТИ ИЗБЫТОЧНОЙ ТЕПЛОЕМКОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Значительное влияние на форму кривых ДСК оказывает соотношение значений ΔH для первой и второй стадий (рис. 3). В том случае, когда $\Delta H_1 = 0$, пик, соответствующий первой стадии, отсутствует и мы видим только пик, соответствующий второй стадии. При $\Delta H_2 = 0$ проявляется только пик, относящийся к первой

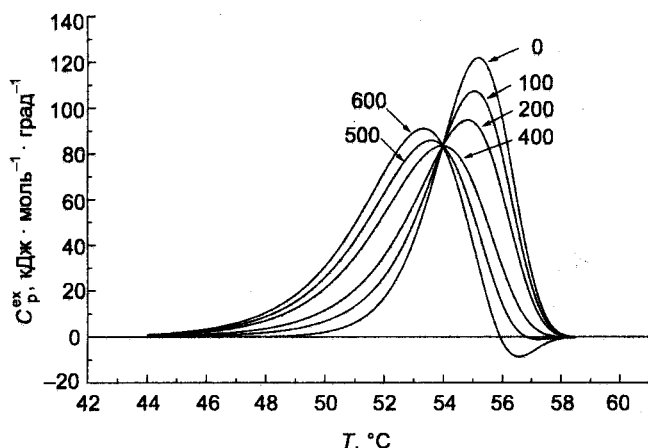


Рис. 3. Температурные профили избыточной теплоемкости при различных соотношениях значений изменения энтальпии для первой и второй стадий. Для всех кривых $E_{a,1} = E_{a,2} = 500$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 + \Delta H_2 = 400$ кДж · моль⁻¹, $T_1^* = T_2^* = 328,16$ К (55°), $v = 1$ град · мин⁻¹. Значения ΔH_1 указаны над кривыми

стадии, и кривая ничем не отличается от кривой, получаемой для одностадийной модели с параметрами, соответствующими параметрам первой стадии.

Согласно [6] для одностадийной модели отношение площадей левой и правой частей пика должно составлять приблизительно $e-1$, т.е. 1,72. Для кривой, соответствующей $\Delta H_2 = 0$, мы получили отношение, равное 1,70. Пик, соответствующий второй стадии, является более симметричным: для кривой, соответствующей $\Delta H_1 = 0$, отношение площадей равно 1,44. В случае равных значений ΔH для первой и второй стадий профиль зависимостей C_p^{ex} от T оказался более асимметричным, чем оба пика (отношение площадей 1,75).

Вторая стадия может быть не только эндотермической, но и экзотермической, т.е. ΔH_2 может принимать отрицательные значения. Экзотермический характер обычно имеют реакции агрегации, которые часто сопровождают процесс денатурации [17]. В этом случае возможно появление отрицательного пика. Как видно из рис. 3, при $\Delta H_2 = -100$ кДж · моль⁻¹ отрицательный пик практически незаметен. Однако в том случае, когда $\Delta H_2 = -200$ кДж · моль⁻¹, этот пик достаточно четко выражен. Появление небольшого отрицательного пика вслед за положительным наблюдалось экспериментально для гликогенфосфорилазы из скелетных мышц кролика [18] и азурина из *Pseudomonas aeruginosa* [19]. Авторы работы [19] также теоретически показали возможность появления отрицательного пика для модели Ламри–Эйринга с быстро устанавливающимся равновесием обратимой стадии.

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ СКАНИРОВАНИЯ НА ФОРМУ КРИВЫХ ЗАВИСИМОСТИ ИЗБЫТОЧНОЙ ТЕПЛОЕМКОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Для необратимой тепловой денатурации характерна зависимость кривой ДСК от скорости сканирования. В случае одностадийной модели с увеличением скорости сканирования форма профиля практически не изменяется, но положение максимума сдвигается в область более высоких температур и при этом происходит некоторое снижение максимального значения избыточной теплоемкости [3, 4].

Для модели, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии, скорость сканирования может существенно влиять на форму кривой ДСК. Так, при $E_{a,1} > E_{a,2}$ чем больше скорость сканирования, тем быстрее процесс переходит в область, где k_1 становится больше, чем k_2 , и где происходит накопление интермедиата U . В результате при больших скоростях сканирования на кривых ДСК может появиться второй пик (или плечо), отсутствующий на кривых, соответствующих малым скоростям сканирования (рис. 4, а).

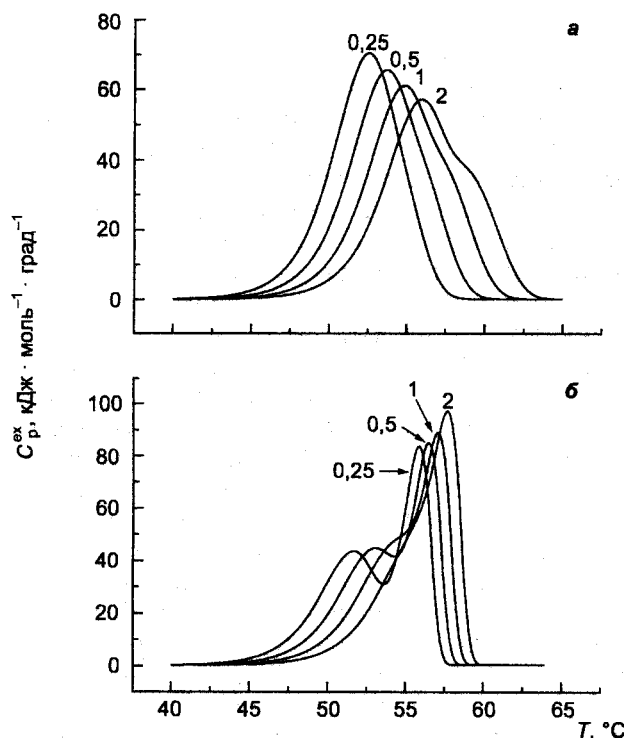


Рис. 4. Влияние скорости сканирования на форму температурных профилей избыточной теплоемкости. Для всех кривых $E_{a,1} = 500$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 = \Delta H_2 = 200$ кДж · моль⁻¹, $T_1^* = 328,16$ К (55°). Значения $E_{a,2}$: 350 (а), 1000 кДж · моль⁻¹ (б), значения T_2^* : 332,16 (а), 330,16 К (б). Значения v указаны над кривыми

Напротив, при $E_{a,1} < E_{a,2}$, когда накоплению интермедиата способствуют более низкие температуры, разделение пиков происходит более эффективно при меньших скоростях сканирования (рис. 4, б).

Появление отрицательного пика в случае экзотермической второй стадии также может зависеть от скорости сканирования. На рис. 5 показан случай, когда при малой скорости ($0,25 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$) отрицательный пик практически незаметен, а с повышением скорости сканирования он становится все более существенным. Аналогичное явление было продемонстрировано для модели Ламри-Эйринга с быстро устанавливающимся равновесием обратимой стадии [19].

МОЖНО ЛИ СВЕСТИ ДВУХСТАДИЙНУЮ МОДЕЛЬ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКА К ОДНОСТАДИЙНОЙ?

Как можно видеть из рис. 1, д, 2, б и 4, в ряде случаев кривые ДСК, описываемые моделью, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии, могут сильно отличаться от кривых, характерных для одностадийной модели необратимой денатурации. Однако во многих других случаях (см., например, рис. 1, а, в) мы получаем один асимметричный пик, который визуально трудно отличить от пика, соответствующего одностадийной модели. Можно ли в этих случаях использовать одностадийную модель для анализа кривой ДСК?

Ранее мы предложили критерии соответствия кривых ДСК одностадийной модели не-

обратимой денатурации [15]. Одним из наиболее простых критериев является линейность зависимости $\ln[v C_p^{ex} / (Q_i - Q)]$ от $1/T$, где Q_i – количество теплоты, поглощенное в процессе денатурации (калориметрическая энтальпия), а Q – количество теплоты, поглощенное при нагревании белка до температуры T . Однако на практике из-за сильных флуктуаций на начальном и конечном участках кривой ДСК для данной анаморфозы приходится ограничиваться средним участком кривой (например, использовать интервал значений отношения Q/Q_i от 5 до 95%).

Более серьезный критерий предполагает построение той же анаморфозы для разных скоростей сканирования. В случае выполнимости одностадийной модели прямые, соответствующие разным скоростям сканирования, должны совпадать.

В качестве примера на рис. 6 приведены в координатах $\{\ln[v C_p^{ex} / (Q_i - Q)]; 1/T\}$ теоретические кривые, полученные для модели, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии, при разных скоростях сканирования. Как можно видеть, приведенные на рисунке линии близки к прямым. Однако при этом линии, соответствующие разным скоростям сканирования, не совпадают.

Далее мы можем формально рассчитать для данных теоретических кривых кажущиеся значения параметров уравнения Аррениуса (E_a и T^*), исходя из одностадийной модели. Результаты расчета с помощью линейного метода наименьших квадратов приведены в табл. 1. Видно, что кажущиеся значения обоих параметров изменяются с изменением скорости сканирования.

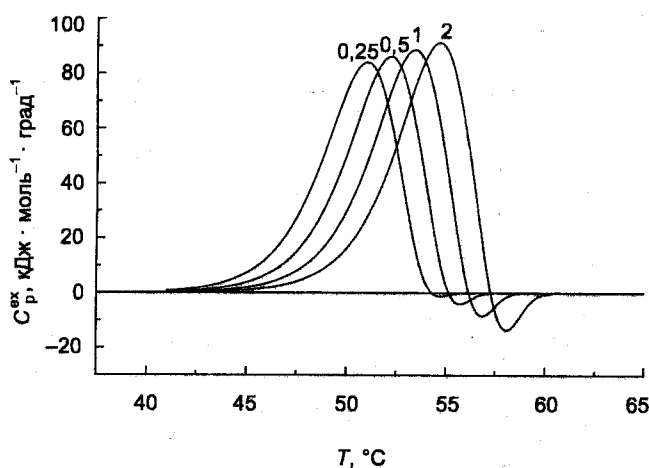


Рис. 5. Влияние скорости сканирования на величину отрицательного пика при экзотермической второй стадии. Для всех кривых $E_{a,1} = E_{a,2} = 500 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $\Delta H_1 = 600 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $\Delta H_2 = -200 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $T_1^* = T_2^* = 328,16 \text{ К}$ (55°). Значения v указаны над кривыми

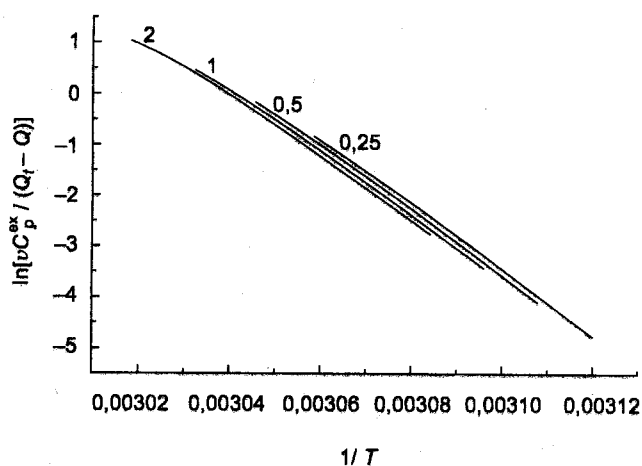


Рис. 6. Теоретические зависимости $\ln[v C_p^{ex} / (Q_i - Q)]$ от $1/T$ при разных скоростях сканирования. Для всех кривых $E_{a,1} = 500 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $E_{a,2} = 300 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $\Delta H_1 = \Delta H_2 = 200 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $T_1^* = T_2^* = 328,16 \text{ К}$ (55°). Значения v указаны над кривыми

Таблица 1. Влияние скорости сканирования на кажущиеся значения параметров уравнения Аррениуса

ν , град · мин ⁻¹	$E_{a, \text{app}}$, кДж · моль ⁻¹	T_{app}^* , К	r
0,25	536,7 ± 0,5	328,25 ± 0,004	0,9999
0,5	530,8 ± 0,6	328,49 ± 0,004	0,9998
1	517,0 ± 0,8	328,78 ± 0,005	0,9996
2	494,0 ± 1,3	329,07 ± 0,006	0,9989

Примечание: кажущиеся значения энергии активации ($E_{a, \text{app}}$) и параметра T^* (T_{app}^*) рассчитаны, исходя из одностадийной модели необратимой денатурации методом линейной регрессии [15] для кривых, показанных на рис. 6 ($E_{a,1} = 500$ кДж · моль⁻¹, $E_{a,2} = 300$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 = \Delta H_2 = 200$ кДж · моль⁻¹, $T_1^* = T_2^* = 328,16$ К); r – коэффициент корреляции.

В табл. 2 представлены расчеты кажущихся значений E_a и T^* для теоретических кривых, показанных на рис. 3, т.е. различающихся значениями ΔH_1 и ΔH_2 (при постоянной их сумме). В данном случае оба параметра также имеют различные кажущиеся значения для каждой кривой.

Особо следует отметить, что в случаях, приведенных в таблицах, параметры уравнения Аррениуса для обеих стадий не изменялись. Полученные же кажущиеся значения параметров не соответствуют таковым ни для первой, ни для второй стадий (кроме случая $\Delta H_2 = 0$, когда

Таблица 2. Влияние соотношения значений изменения энthalпии для первой и второй стадий на кажущиеся значения параметров уравнения Аррениуса

ΔH_1 , кДж · моль ⁻¹	$E_{a, \text{app}}$, кДж · моль ⁻¹	T_{app}^* , К	r
0	724,7 ± 2,6	328,78 ± 0,006	0,9985
100	649,6 ± 0,6	328,72 ± 0,002	0,9999
200	568,1 ± 0,5	328,66 ± 0,003	0,9999
400	500,0 ± 0,0	328,16 ± 0,000	1,0000
500	517,8 ± 0,6	327,60 ± 0,004	0,9997
600	557,1 ± 2,3	326,97 ± 0,013	0,9972

Примечание: кажущиеся значения энергии активации ($E_{a, \text{app}}$) и параметра T^* (T_{app}^*) рассчитаны, исходя из одностадийной модели необратимой денатурации методом линейной регрессии [15] для кривых, показанных на рис. 3 ($E_{a,1} = E_{a,2} = 500$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 + \Delta H_2 = 400$ кДж · моль⁻¹, $T_1^* = T_2^* = 328,16$ К (55°), $\nu = 1$ град · мин⁻¹); r – коэффициент корреляции.

двухстадийная модель действительно сводится к одностадийной). Таким образом, можно сделать вывод, что использование одностадийной модели в случае денатурации белка, которая подчиняется модели, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии, не дает адекватной информации о кинетических характеристиках процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 96-04-50819 и 96-04-10016С).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Privalov, P.L., and Potekhin, S.A. (1986) *Methods Enzymol.*, **131**, 4–51.
2. Sturtevant, J.M. (1987) *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **38**, 463–488.
3. Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L., and Sanchez-Ruiz, J.M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **19**, 159–188.
4. Sanchez-Ruiz, J.M. (1995) *Subcellular Biochemistry*, **24**, 133–176.
5. Lumry, R., and Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.*, **58**, 110–120.
6. Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M., and Mateo, P.L. (1988) *Biochemistry*, **27**, 1648–1652.
7. Sanchez-Ruiz, J.M., Lopez-Lacomba, J.L., Mateo, P.L., Vilanova, M., Serra, M.A., and Aviles, F.X. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **176**, 225–230.
8. Guzmán-Casado, M., Parody-Morreale, A., Mateo, P.L., and Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **188**, 181–185.
9. Morin, P.E., Diggs, D., and Freire, E. (1990) *Biochemistry*, **29**, 781–788.
10. Lepock, J.R., Rodahl, A.M., Zhang, C., Heynen, M.L., Waters, B., and Cheng, K.-H. (1990) *Biochemistry*, **29**, 681–689.
11. Conejero-Lara, F., Sánchez-Ruiz, J.M., Mateo, P.L., Burgos, F.J., Vendrell, J., and Avilés, F.X. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **200**, 663–670.
12. Kreimer, D.I., Shnyrov, V.L., Villar, E., Silman, I., and Weiner, L. (1995) *Protein Sci.*, **4**, 2349–2357.
13. Garda-Salas, A.L., Santamaria, R.I., Marcos, M.J., Zhadan, G.G., Villar, E., and Shnyrov, V.L. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 161–170.
14. Shnyrov, V.L., Marcos, M.J., and Villar, E. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **39**, 647–656.
15. Kurganov, B.I., Lyubarev, A.E., Sánchez-Ruiz, J.M., and Shnyrov, V.L. (1997) *Biophys. Chem.*, **69**, 125–135.
16. Любарев А.Е., Курганов Б.И., Бурлакова А.А., Орлов В.Н., Поглазов Б.Ф. (1998) *Докл. РАН*, **358**, в печати.
17. Klibanov, A.M., and Ahern T.J. (1987) in *Protein Engineering* (Oxender, D.L., and Fox C.F., eds), Alan R. Liss, N.Y., pp. 213–218.
18. Centeno, F., Fernandez-Salguero, P., Laynez, J.L., and Gutierrez-Merino, C. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 625–634.
19. Milardi, D., La Rosa, C., and Grasso, D. (1994) *Biophys. Chem.*, **52**, 183–189.

**MODELING OF IRREVERSIBLE THERMAL PROTEIN DENATURATION
UNDER VARIABLE TEMPERATURE. I. THE MODEL INVOLVING TWO
CONSECUTIVE IRREVERSIBLE STEPS**

A.E.Lyubarev, B.I.Kurganov

*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninsky prosp. 33, Moscow, 117071 Russia; fax (095)954-2732, e-mail: inbio@glas.apc.org*

Submitted November 13, 1997

The model of thermal protein denaturation involving two consecutive irreversible steps has been analysed. The equation describing the dependence of excess heat capacity (C_p^{ex}) on temperature (T) under a constant scanning rate has been obtained and used for construction of theoretical C_p^{ex} versus T profiles. The change in the shape of theoretical profiles at varied Arrhenius equation parameters, ratio for enthalpies for the first and second steps, and the scanning rate have been studied. It has been shown that formal use of one-step model does not provide adequate information about kinetic features of the process in the case of protein denaturation following the mechanism involving two consecutive irreversible steps.

KEY WORDS: protein denaturation, differential scanning calorimetry, Arrhenius equation.