

УДК 577.152

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА НЕОБРАТИМОЙ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКА ПРИ ПЕРЕМЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ. II. ПОЛНАЯ КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЛАМРИ-ЭЙРИНГА

© 1999 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 13.11.98
После доработки 07.12.98

Проведен теоретический анализ модели тепловой денатурации белка, включающей последовательно протекающие обратимую и необратимую стадии (модель Ламри-Эйринга). Рассмотрен наиболее общий случай, когда равновесие на первой стадии устанавливается медленно по сравнению со скоростью второй стадии, а величина теплового эффекта для второй стадии больше или меньше нуля. Построены теоретические кривые, описывающие зависимость избыточной теплоемкости от температуры. Исследовано изменение формы кривых при варьировании следующих величин: изменения энтальпии для второй стадии, параметров уравнения Аррениуса для обеих стадий, скорости сканирования температуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: денатурация белка, модель Ламри-Эйринга, уравнение Аррениуса, дифференциальная сканирующая калориметрия.

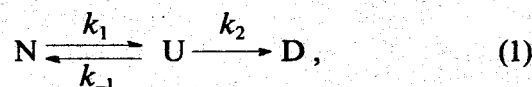
Для изучения тепловой денатурации белков широко используется метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Математический анализ получаемых этим методом зависимостей теплоемкости белка (C_p) от температуры (T) позволяет определить термодинамические и кинетические характеристики процесса денатурации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

Математический аппарат для анализа данных ДСК наиболее подробно разработан для механизмов обратимой равновесной денатурации белков [1–3]. Известно, однако, что многие белки в ходе калориметрических экспериментов денатурируют необратимо [3, 4]. Для интерпретации данных ДСК в этих случаях необходимы специально разработанные методы анализа.

Простейшей моделью необратимой денатурации белка является модель, включающая одну необратимую стадию. Математические методы анализа кривых ДСК для белков, тепловая денатурация которых удовлетворяет данной модели, предложены в работах Санчез-Руиза и соавторов [5–7]. Однако, как было показано [7–9], одностадийная модель не вполне точно описывает необратимую денатурацию ряда белков.

Принято считать, что денатурация белка может быть описана моделью Ламри-Эйринга [10], включающей последовательно протекающие

одну обратимую и одну необратимую стадии:



где N, U и D – нативное, частично развернутое и денатурированное состояния белка, k_1 , k_{-1} и k_2 – константы скорости соответствующих реакций. В ряде работ предпринималась попытка использовать данную модель для описания тепловой денатурации конкретных белков [8, 11–15].

В настоящей работе проводится теоретический анализ кривых ДСК для белков, денатурация которых описывается данной моделью, при различных значениях параметров.

МОДЕЛЬ ЛАМРИ-ЭЙРИНГА И ЕЕ ЧАСТНЫЕ СЛУЧАИ

Кинетическое поведение системы, описываемой моделью (1), при постоянной скорости сканирования $v = dT/dt$ (T – абсолютная температура, t – время) определяется системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{d\gamma_N}{dT} = \frac{1}{v} (k_{-1}\gamma_U - k_1\gamma_N) \\ \frac{d\gamma_U}{dT} = \frac{1}{v} (k_1\gamma_N - k_2\gamma_U - k_{-1}\gamma_U) \end{cases}, \quad (2)$$

*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

где γ_N и γ_U – соответственно молярная доля нативного и частично развернутого белка. Эта система не имеет аналитического решения.

Зависимость констант скорости отдельных стадий процесса (k_1 , k_{-1} и k_2) от температуры описывается уравнением Аррениуса, которое удобно записать в следующей форме:

$$k = \exp \left\{ \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right\}, \quad (3)$$

где E_a – энергия активации, R – газовая постоянная и T^* – температура, при которой константа скорости равна 1 мин⁻¹.

Избыточное изменение энтальпии реакции $\langle \Delta H \rangle$ складывается из избыточных изменений энтальпии обеих стадий и равно

$$\langle \Delta H \rangle = \Delta H_1 (1 - \gamma_N) + \Delta H_2 (1 - \gamma_N - \gamma_U), \quad (4)$$

где ΔH_1 и ΔH_2 – молярные изменения энтальпии для первой и второй стадий. Избыточная теплоемкость с учетом системы уравнений (2) выражается уравнением

$$C_p^{ex} = \frac{d\langle \Delta H \rangle}{dT} = \frac{\Delta H_1}{v} (k_1 \gamma_N - k_{-1} \gamma_U) + \frac{\Delta H_2}{v} k_2 \gamma_U. \quad (5)$$

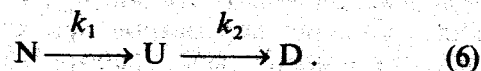
Зависимость γ_N и γ_U от температуры для каждого набора параметров может быть определена путем численного решения системы дифференциальных уравнений (2).

С учетом того, что изменение энтальпии для первой стадии и энергии активации прямой и обратной реакций связаны соотношением $\Delta H = E_{a,1} - E_{a,-1}$, зависимость избыточной теплоемкости C_p^{ex} от температуры определяется скоростью сканирования v и семью параметрами процесса денатурации: энергией активации и параметром T^* для каждой из трех реакций и изменением энтальпии для второй стадии.

В качестве частных случаев модели Ламри-Эйринга могут рассматриваться как одностадийная обратимая, так и одностадийная необратимая модели [16]. Первый вариант может реализоваться в случае, если скорость второй стадии настолько мала, что форма N трансформируется в форму U без заметного превращения последней в форму D. Второй вариант возможен, когда скорость второй стадии настолько велика, что прямая реакция первой стадии является скоростью-лимитирующей, а обратная реакция практически отсутствует.

Более сложным частным случаем модели Ламри-Эйринга является модель, включающая две

последовательно протекающие необратимые стадии:



Эта модель реализуется для ситуации, когда скорость обратной реакции на первой стадии мала по сравнению со скоростью второй стадии. В отличие от одностадийной необратимой модели в данном случае скорость прямой реакции первой стадии сравнима по величине со скоростью второй стадии. Теоретический анализ данной модели проведен нами в работе [17]. С помощью этой модели нами была описана тепловая денатурация уридинфосфорилазы из *Escherichia coli* [18, 19].

Еще одним частным случаем полной кинетической модели Ламри-Эйринга можно считать модель Ламри-Эйринга с быстро устанавливающимся равновесием на первой стадии. Эта модель анализировалась в работах [11, 20]. Модель была использована для описания тепловой денатурации азурина из *Pseudomonas aeruginosa* [11–13].

Полная кинетическая модель Ламри-Эйринга исследовалась применительно к данным ДСК только в работе Лепока и соавторов [16]. Однако ими был проведен анализ только ситуации, когда вторая стадия не сопровождается тепловым эффектом ($\Delta H_2 = 0$). Кроме того, в этой работе изучалось влияние на форму кривых ДСК только одного параметра (T_1^*). В настоящей работе предпринято более широкое исследование модели Ламри-Эйринга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для расчета модельных кривых, описывающих зависимость избыточной теплоемкости (C_p^{ex}) от температуры в соответствии с уравнениями (2), (3) и (5), мы использовали коммерческий программный пакет Scientist («MicroMath Inc.», США). Во всех случаях значение ΔH_1 было принято равным 400 кДж · моль⁻¹ (как в работе [16]), а значение T_1^* – 328,16 К (55°). Значения остальных параметров варьировались.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние параметра T_2^* на форму кривых, описывающих зависимость избыточной теплоемкости от температуры. Рассмотрим первоначально наиболее простой случай модели Ламри-Эйринга, когда тепловой эффект второй стадии отсутствует ($\Delta H_2 = 0$), а энергия активации второй

стадии процесса равна энергии активации прямой реакции первой стадии ($E_{a,1} = E_{a,2}$). Значения последних параметров приняты равными $685 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ (как в работе [16]). Значение скорости сканирования выбрано равным $1 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$; значения параметров T_1^* и T_2^* ($328,16$ и $319,92 \text{ К}$) взяты таким образом, чтобы температура (T_m), при которой константа равновесия первой стадии равна единице, составляла 334 К ($61,1^\circ$), а значения k_1 и k_{-1} при этой температуре были равны 100 мин^{-1} .

На рис. 1 приведены кривые, отражающие зависимость C_p^{ex} от температуры при различных значениях параметра T_2^* . Аналогичный набор профилей был получен в работе [16]. Кривая 1 соответствует значению параметра T_2^* , для которого отношение k_1/k_2 при температуре T_m равно 10^{-4} . В этом случае кинетическое поведение системы определяется только скоростью прямой реакции первой стадии и модель Ламри-Эйринга сводится к одностадийной необратимой модели. Действительно, кривая 1 совпадает с кривой, построенной, исходя из одностадийной модели для тех значений параметров, которые соответствуют значениям параметров прямой реакции первой стадии.

Кривая 8 соответствует значению параметра T_2^* , для которого отношение k_1/k_2 при температуре T_m равно 10^6 . В этом случае вторая реакция практически отсутствует и модель Ламри-Эйринга сводится к одностадийной обратимой мо-

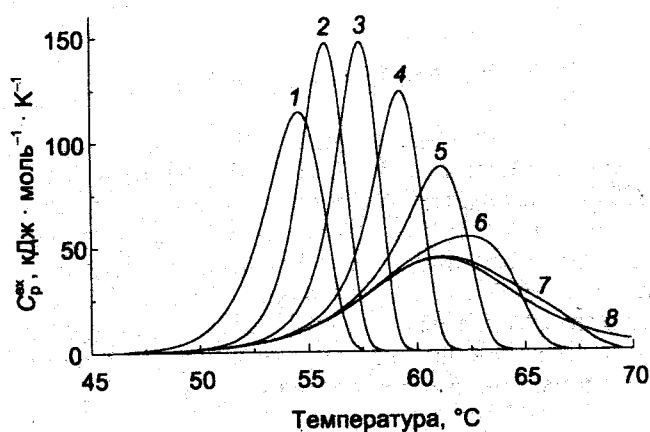


Рис. 1. Зависимости избыточной теплоемкости (C_p^{ex}) от температуры, рассчитанные для различных значений параметра T_2^* . Для всех кривых $E_{a,1} = E_{a,2} = 685 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $E_{a,-1} = 285 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $\Delta H_1 = 400 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $\Delta H_2 = 0$, $T_1^* = 328,16 \text{ К}$ (55°), $T_2^* = 319,92 \text{ К}$, $\nu = 1 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$. Значения параметра T_2^* (в скобках — отношение констант k_1/k_2 при температуре, для которой константа равновесия первой стадии равна единице): 1 — $316,5 \text{ К}$ (10^{-4}), 2 — $325,2 \text{ К}$ ($0,1$), 3 — $328,2 \text{ К}$ (1), 4 — $331,2 \text{ К}$ (10), 5 — $334,3 \text{ К}$ (100), 6 — $337,4 \text{ К}$ (1000), 7 — $340,7 \text{ К}$ (10^5), 8 — $347,3 \text{ К}$ (10^6)

дели. Кривая 7 (отношение k_1/k_2 при температуре T_m равно 10^4) почти не отличается от кривой 8, лишь нисходящая ветвь идет немного круче.

Кривые 2–6 соответствуют значениям параметра T_2^* , для которых отношение k_1/k_2 при температуре T_m составляет от $0,1$ до 1000 . В этих случаях кинетическое поведение системы определяется всеми тремя реакциями.

На рис. 2 для четырех значений параметра T_2^* показано, как с изменением температуры меняются доли форм N, U и D. Видно, что в том случае, когда отношение k_1/k_2 при температуре T_m равно 10^{-4} , накопления формы U не происходит (а). При отношении k_1/k_2 , равном единице, форма U накапливается в относительно небольших количествах (б). В случае, когда отношение k_1/k_2 равно 1000 , происходит значительное накопление интермедиата (в). При отношении k_1/k_2 , равном 10^6 , превращения формы U в форму D не наблюдается до тех пор, пока практически весь нативный белок N не перейдет в частично развернутую форму U (г).

Важной визуальной характеристикой кривой ДСК является степень асимметрии пика. Ее можно оценить как отношение теплоты, поглощенной до достижения точки максимума, к теплоте, поглощенной после этой точки (т.е. отношение площадей левой и правой частей пика) [17, 21]. Для кривых ДСК, удовлетворяющих одностадийной необратимой модели, это отношение равно $1,7$ [17, 21]. Такое же значение мы получили для кривой 1 на рис. 1. Для кривой 2 степень асимметрии также равна $1,7$, для кривой 3 — $1,8$, для кривой 4 — $2,0$. Наиболее асимметричными получились кривые 5 и 6 ($2,4$ и $2,2$ соответственно). Что касается кривых 7 и 8, то для них степень асимметрии равна $1,0$, что характерно для одностадийной обратимой модели.

Влияние изменения энтальпии для второй стадии процесса денатурации на форму кривых, описывающих зависимость избыточной теплоемкости от температуры. Рассмотрим теперь случай, когда вторая стадия процесса денатурации сопровождается заметным тепловым эффектом. Вторая стадия может быть как эндотермической ($\Delta H_2 > 0$), так и экзотермической ($\Delta H_2 < 0$).

На рис. 3 приведены кривые, описывающие зависимость C_p^{ex} от температуры при различных значениях ΔH_2 . Видно, что в том случае, когда накопление интермедиата U мало (а), величина изменения энтальпии для второй стадии незначительно влияет на форму кривых (степень асимметрии пика немного увеличивается для экзотермического случая: $2,0$ при $\Delta H_2 = -200 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$).

Когда интермедиат накапливается в значительных количествах (б, в), влияние величины изменения энтальпии для второй стадии процес-

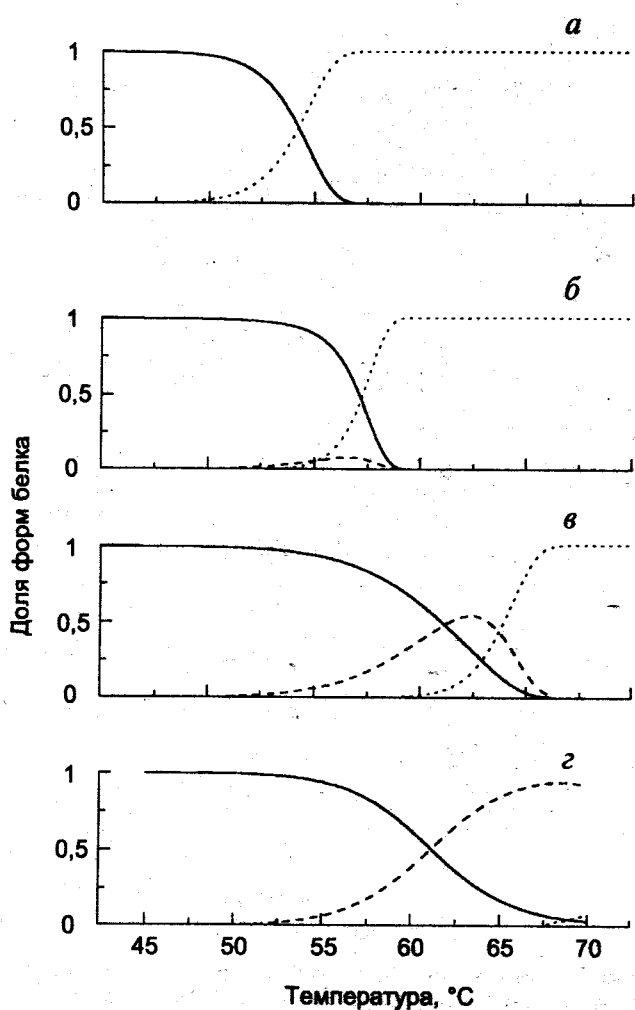


Рис. 2. Температурные зависимости долей нативной формы белка (N) и форм белка, возникающих в процессе денатурации: частично развернутой (U) и денатурированной (D). Для всех кривых $E_{a,1} = E_{a,2} = 685 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $E_{a,-1} = 285 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $\Delta H_1 = 400 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $\Delta H_2 = 0$, $T_1^* = 328,16 \text{ К}$ (55°), $T_2^* = 319,92 \text{ К}$, $v = 1 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$. Значения параметра T_2^* (в скобках – отношение констант k_1/k_2 при температуре, при которой константа равновесия первой стадии равна единице): а – $316,5 \text{ К}$ (10^{-4}), б – $328,2 \text{ К}$ (1), в – $337,4 \text{ К}$ (1000), г – $347,3 \text{ К}$ (10^6)

са на форму кривых, описывающих зависимость C_p^{ex} от T , оказывается существенным. В экзотермическом случае наблюдается появление отрицательного пика в области высоких температур. В эндотермическом случае может наблюдаться появление второго положительного пика (в). Это связано с тем, что максимальные значения скоростей для первой и второй стадий процесса денатурации достигаются в разных температурных интервалах.

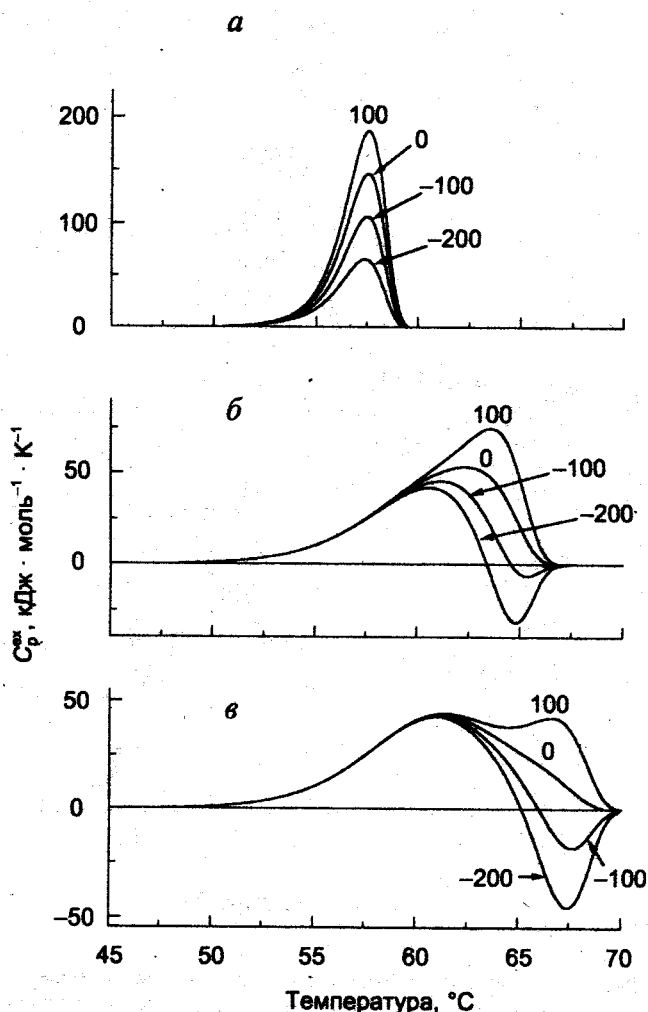


Рис. 3. Зависимости избыточной теплоемкости от температуры, рассчитанные для различных значений изменения энтропии для второй стадии процесса денатурации. Для всех кривых $E_{a,1} = E_{a,2} = 685 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $E_{a,-1} = 285 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $\Delta H_1 = 400 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, $T_1^* = 328,16 \text{ К}$ (55°), $T_2^* = 319,92 \text{ К}$, $v = 1 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$. Значения параметра T_2^* (в скобках – отношение констант k_1/k_2 при температуре, при которой константа равновесия первой стадии равна единице): а – $328,2 \text{ К}$ (1), б – $337,4 \text{ К}$ (1000), в – $340,7 \text{ К}$ (10^6). Значения ΔH_2 (кДж · моль $^{-1}$) указаны над кривыми

Влияние величины энергии активации второй стадии процесса денатурации на форму кривых, описывающих зависимость избыточной теплоемкости от температуры. Рассмотрим теперь случай, когда энергия активации второй стадии отличается от энергии активации прямой реакции первой стадии процесса. На рис. 4 показаны кривые, описывающие зависимость C_p^{ex} от температуры при различных значениях $E_{a,2}$. Когда накопление интермедиата U мало (а), влияние ве-

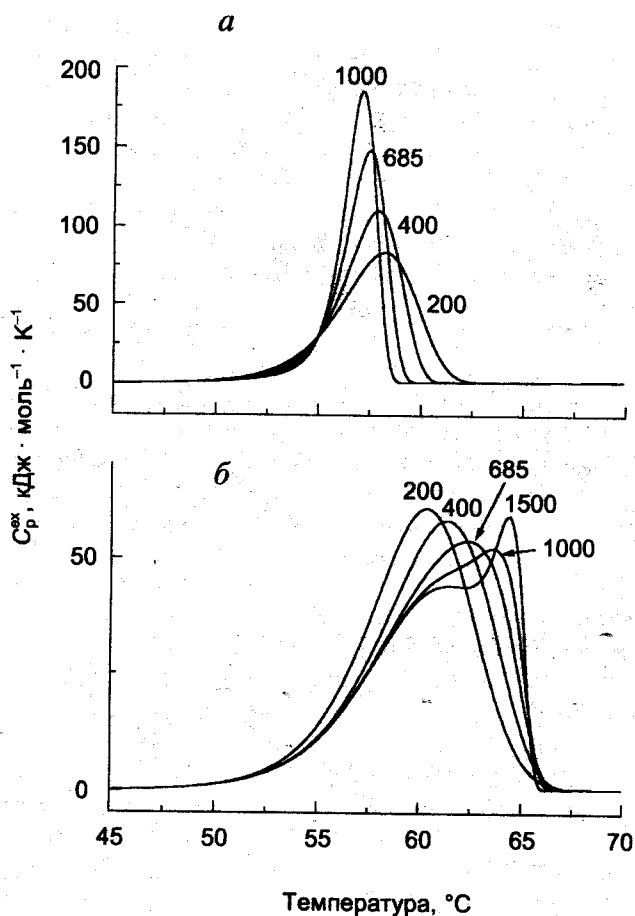


Рис. 4. Зависимости избыточной теплоемкости от температуры, рассчитанные для различных значений энергии активации второй стадии процесса. Для всех кривых $E_{a,1} = 685$ кДж · моль⁻¹, $E_{a,-1} = 285$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 = 400$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_2 = 0$, $T_1^* = 328,16$ К (55°), $T_2^* = 319,92$ К, $v = 1$ град · мин⁻¹. Значения параметра T_2^* (в скобках – отношение констант k_1/k_2 при температуре, при которой константа равновесия первой стадии равна единице): а – 328,2 К (1), б – 337,4 К (1000). Значения $E_{a,2}$ (кДж · моль⁻¹) указаны над кривыми

личины энергии активации второй стадии проявляется в изменении ширины пика (чем больше $E_{a,2}$, тем уже пик) и в некотором смещении положения максимума (чем больше $E_{a,2}$, тем ниже температура, при которой наблюдается максимум). Степень асимметрии пика меняется мало – от 1,6 для $E_{a,2} = 200$ кДж · моль⁻¹ до 1,8 для $E_{a,2} = 1000$ кДж · моль⁻¹.

В том случае, когда интермедиат накапливается в значительных количествах (б), форма кривой существенно зависит от величины энергии активации второй стадии. При $E_{a,2} = 200$ кДж · моль⁻¹ кривая получается достаточно симметричной (степень асимметрии 1,4); при $E_{a,2} = 1000$ кДж · моль⁻¹ наблюдается резкая асимметрия и на

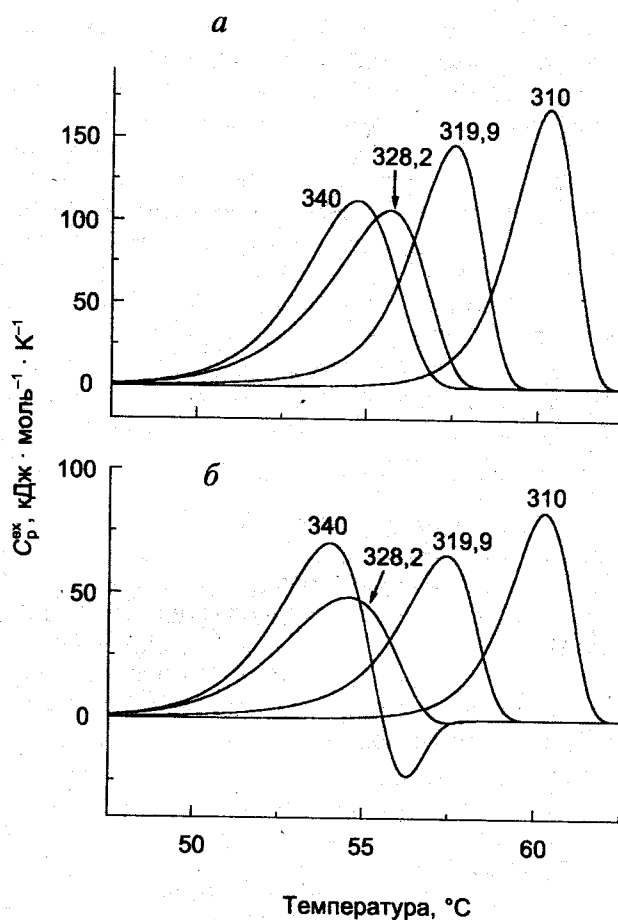


Рис. 5. Зависимости избыточной теплоемкости от температуры, рассчитанные для различных значений параметра T_1^* . Для всех кривых $E_{a,1} = E_{a,2} = 685$ кДж · моль⁻¹, $E_{a,-1} = 285$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 = 400$ кДж · моль⁻¹, $T_1^* = T_2^* = 328,16$ К (55°), $v = 1$ град · мин⁻¹. Значения ΔH_2 : 0 (а), -200 кДж · моль⁻¹ (б). Значения параметра T_1^* (К) указаны над кривыми

кривой появляется дополнительное плечо; при $E_{a,2} = 1500$ кДж · моль⁻¹ на кривой отчетливо видны два пика.

Влияние параметров обратной реакции на форму кривых, описывающих зависимость избыточной теплоемкости от температуры. Варьирование значений параметра T_1^* оказывает существенное влияние на положение максимума на кривой ДСК (рис. 5). Так, при $T_1^* = 340$ К ($T_1^* = T_2^* = 328,2$ К) в интервале температур 50–57° (323–330 К) значения констант скорости k_1 и k_2 значительно превышают значение константы k_{-1} , поэтому в данном случае модель Ламри–Эйринга сводится к модели (б), включающей только две последовательно протекающие необратимые стадии.

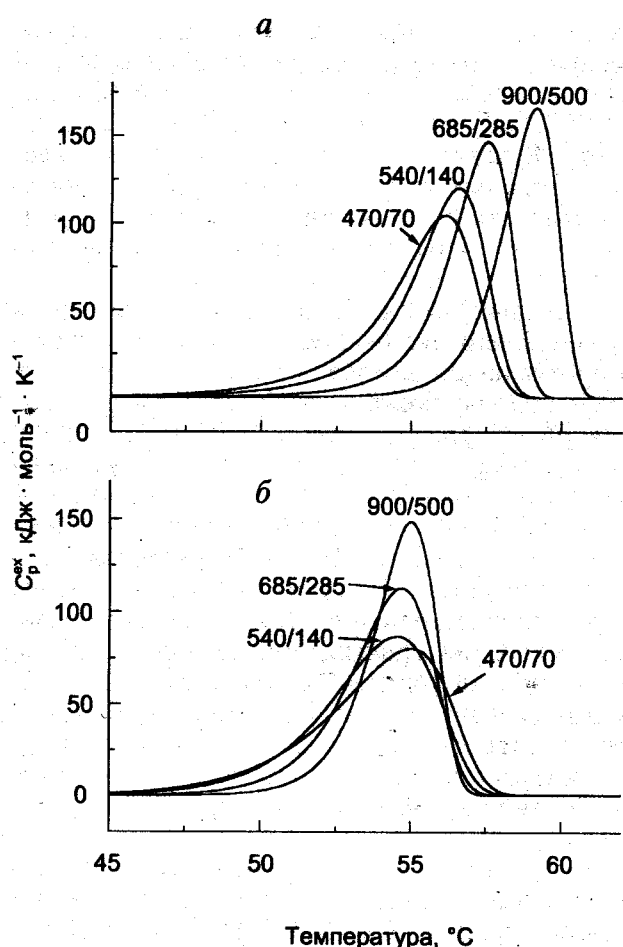


Рис. 6. Зависимости избыточной теплоемкости от температуры, рассчитанные с использованием различных значений энергии активации для реакций первой стадии процесса денатурации. Для всех кривых $\Delta H_1 = 400$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_2 = 0$, $T_1^* = T_2^* = 328,16$ К (55°), $\nu = 1$ град · мин⁻¹. Значения параметра T_1^* : 319,9 К (а), 340 К (б). Значения $E_{a,1}/E_{a,2}$ (кДж · моль⁻¹) указаны над кривыми

В случае $T_1^* = 310$ К при относительно низких температурах константа скорости обратной реакции значительно превышает константы скорости прямых реакций, поэтому денатурация начинается при температурах выше 55°.

Отметим, что при $T_1^* = T_1^* = T_2^* = 328,2$ К пик оказывается наиболее асимметричным (степень асимметрии составляет 2,0, в то время как для $T_1^* = 310$ и 340 К степень асимметрии равна 1,7) и максимальное значение избыточной теплоемкости оказывается меньше соответствующего значения для кривых, полученных как при больших, так и при меньших значениях параметра T_1^* (рис. 5, а).

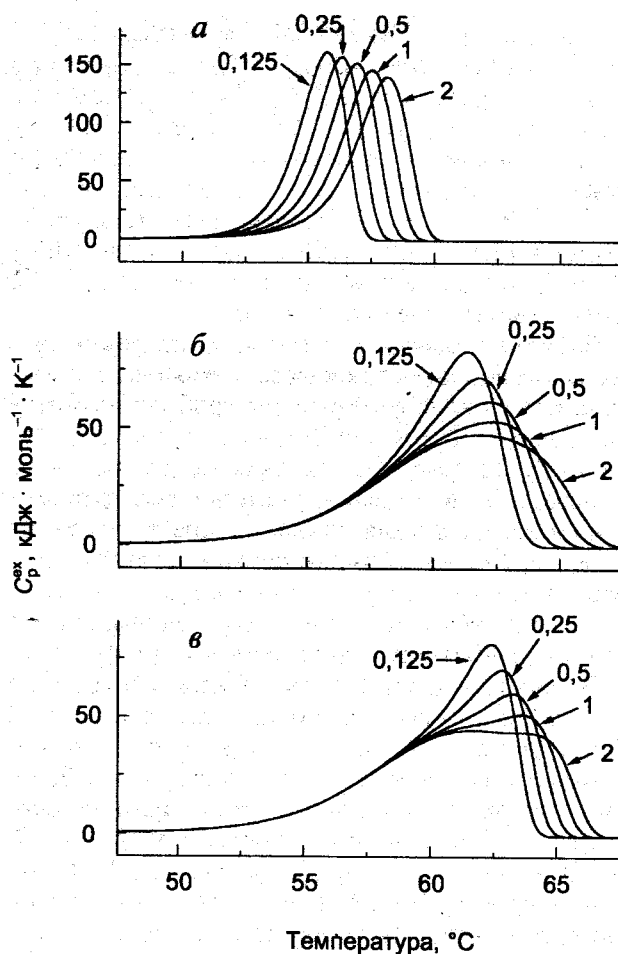


Рис. 7. Влияние скорости сканирования на форму кривых зависимости избыточной теплоемкости от температуры. Для всех кривых $E_{a,1} = 685$ кДж · моль⁻¹, $E_{a,2} = 285$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_1 = 400$ кДж · моль⁻¹, $\Delta H_2 = 0$, $T_1^* = 328,16$ К (55°), $T_1^* = 319,92$ К. Значения $E_{a,2}$: 685 (а, б), 1000 кДж · моль⁻¹ (в). Значения параметра T_2^* (в скобках – отношение констант k_1/k_2 при температуре, при которой константа равновесия первой стадии равна единице): а – 328,2 К (1), б, в – 337,4 К (1000). Значения ν (град · мин⁻¹) указаны над кривыми

В случае, когда вторая стадия процесса является экзотермической (рис. 5, б), отрицательный пик появляется только при $T_1^* = 340$ К.

Изменение энергий активации прямой и обратной реакций первой стадии процесса (при сохранении значения их разности, т.е. величины изменения энтальпии для первой стадии) оказывает различное влияние на форму кривых в координатах $\{C_p^{ex}; T\}$ в зависимости от соотношения значений параметров T_1^* и T_2^* (рис. 6). Так, при $T_1^* < T_2^*$ (а) увеличение энергии активации приводит к существенному сдвигу положения максимума, увеличению максимального значения избыточной теплоемкости и снижению сте-

пени асимметрии пика (с 2,0 для $70 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ до 1,75 для $500 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$).

В том случае, когда $T_1^* > T_2^*$ (б), положение максимума существенно не меняется. Максимальное значение избыточной теплоемкости также увеличивается с ростом энергии активации. При $E_{a,1} = 70 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ пик резко асимметричен (2,1), увеличение энергии активации с 140 до $500 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ мало влияет на степень асимметрии (последняя составляет $\sim 1,7$).

Влияние скорости сканирования на форму кривых, описывающих зависимость 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 меняется, но положение максимума сдвигается в область более высоких температур; при этом происходит некоторое снижение максимального значения избыточной теплоемкости [3, 4].

В случае модели Ламри-Эйринга возможна аналогичная ситуация, когда скорость второй стадии процесса велика и не происходит значительного накопления интермедиата (рис. 7, а). Если интермедиат накапливается, влияние скорости сканирования проявляется иначе (рис. 7, б, в). Так, для отношения k_1/k_2 , равного 1000 при температуре T_m (б), с ростом скорости сканирования положение максимума сдвигается незна-

чительно, зато существенно снижается максимальное значение избыточной теплоемкости, а также степень асимметрии — с 2,4–2,5 для $v = 0,125\text{--}0,5 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$ до 1,5 для $v = 2 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$. В случае более высоких значений энергии активации второй стадии (в) при увеличении скорости сканирования на кривых зависимости C_p^{ex} от T появляется дополнительное плечо или второй пик.

В предыдущей работе мы показали, что в случае модели, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии, скорость сканирования также оказывает существенное влияние на форму кривых ДСК [17]. Однако влияние скорости сканирования для двух моделей неодинаково. Так, в случае модели, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии, при $E_{a,2} > E_{a,1}$ разделение пиков происходит более эффективно при меньших скоростях сканирования. Таким образом, наличие нескольких кривых, описывающих зависимость избыточной теплоемкости от температуры при разных скоростях сканирования, позволяет сделать заключение о возможном механизме денатурации и дать качественную оценку соотношений параметров 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. Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M., and Mateo, P.L. (1988) *Biochemistry*, **27**, 1648–1652.
6. 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.
7. Kurganov, B.I., Lyubarev, A.E., Sánchez-Ruiz, J.M., and Shnyrov, V.L. (1997) *Biophys. Chem.*, **69**, 125–135.
8. Tello-Solis, S.R., and Hernandez-Arana, A. (1995) *Biochem. J.*, **311**, 969–974.
9. Davoodi, J., Wakarchuk, W.W., Surewicz, W.K., and Carey, P.R. (1998) *Protein Sci.*, **7**, 1538–1544.
10. Lumry, R., and Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.*, **58**, 110–120.
11. Milardi, D., La Rosa, C., and Grasso, D. (1994) *Biophys. Chem.*, **52**, 183–189.
12. La Rosa, C., Milardi, D., Grasso D., Guzzi, R., and Sportelli, L. (1995) *J. Phys. Chem.*, **99**, 14864–14870.
13. Guzzi, R., La Rosa, C., Grasso, D., Milardi, D., and Sportelli, L. (1996) *Biophys. Chem.*, **60**, 29–38.
14. Singh, N., Liu, Z., and Fisher, H.F. (1996) *Biophys. Chem.*, **63**, 27–36.
15. Vogl, T., Jatzke, C., Hinz, H.-J., Benz, J., and Huber, R. (1997) *Biochemistry*, **36**, 1657–1668.
16. Lepock, J.R., Ritchie, K.P., Kolios, M.C., Rodahl, A.M., Heinz, K.A., and Kruuv, J. (1992) *Biochemistry*, **31**, 12706–12712.
17. Любарев А.Е., Курганов Б.И. (1998) *Биохимия*, **63**, 516–523.
18. Любарев А.Е., Курганов Б.И., Бурлакова А.А., Орлов В.Н., Поглазов Б.Ф. (1998) *Докл. РАН*, **358**, 830–832.
19. Lyubarev, A.E., Kurganov, B.I., Burlakova, A.A., and Orlov, V.N. (1998) *Biophys. Chem.*, **70**, 247–257.
20. Sanchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.*, **61**, 921–935.
21. Потехин С.А., Ковригин Е.Л. (1998) *Биофизика*, **43**, 223–232.

**MODELING OF IRREVERSIBLE THERMAL PROTEIN
DENATURATION UNDER VARIABLE TEMPERATURE.
II. THE WHOLE KINETIC MODEL OF LUMRY AND EYRING**

A.E. Lyubarev, B.I. Kurganov

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

Submitted November 13, 1998
Revision submitted December 7, 1998

The model of thermal protein denaturation involving consecutive reversible and irreversible steps (Lumry and Eyring model) has been analysed. The most general case when equilibrium at the first step is established slowly in comparison with the rate of the second step and the heat effect value for the second step is greater or less than zero has been considered. The theoretical dependences of excess heat capacity on temperature have been constructed. The variation of the shape of the curves at varied values of the enthalpy change for the second step, Arrhenius equation parameters for both steps, as well as the scanning rate has been studied.

KEY WORDS: protein denaturation, Lumry and Eyring model, Arrhenius equation, differential scanning calorimetry.