

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.3

ФАЗОВЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ РАСТВОРОВ И ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКА

С. П. Рожков, А. С. Горюнов

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Образование белковых конденсированных фаз (кристаллов, олигомеров, других твердотельных агрегатов, а также плотных жидкостей и гелей), в том числе безмембранных микроскопических и наноразмерных фаз, играет важную роль в функциональной активности белка в цитоплазме живой клетки, является значимым аспектом белковых исследований и биотехнологий, а также обуславливает различные патологии в живом организме. Многие явления, связанные с образованием интермедиатов сворачивания белковых молекул, до сих пор не получили термодинамической трактовки. Это снижает предсказательный потенциал фазовых диаграмм состояний белкового раствора, используемых для описания состояния молекул белка в разнообразных физиологических и биотехнологических условиях. В работе делается попытка проследить взаимосвязь фазовых переходов типа жидкость-жидкость (L–L) в дисперсиях глобулярных белков с явлениями тепловой и холодной денатурации. Показано, что анализ изобар фазовой диаграммы в координатах давление – температура и температура – энтропия позволяет предсказать появление новых фазовых состояний, образованных интермедиатами сворачивания, в дисперсии белка. Они находятся в метастабильном равновесии с макрофазой, образованной нативными или денатурированными формами молекул белка. Термодинамическое равновесие достигается за счет того, что интермедиаты сворачивания образуют фазы микроскопических размеров, которые стабилизируются за счет капиллярного эффекта. Тем самым при одном и том же внешнем давлении, действующем на дисперсию, обеспечивается равенство химических потенциалов всех молекул белка, необходимое для термодинамической устойчивости системы. Вне денатурационного температурного интервала интермедиаты приобретают основную конформацию и происходит фазовый переход типа L–L, так как исчезают причины, вызывающие необходимость фазового разделения. Такой подход позволил также показать, что метастабильные фазовые равновесия нативный белок – интермедиат и денатурированный белок – интермедиат имеют признаки равновесия типа L–L в области как низких, так и повышенных температур, и объяснить их существование вдали от области фазового перехода первого рода.

Ключевые слова: фазовые диаграммы белкового раствора; тепловая и холодная денатурация белка; бинадаль; интермедиаты сворачивания белка; фазовые переходы; капиллярное давление.

S. P. Rozkov, A. S. Goryunov. PHASE PROPERTIES OF PROTEIN SOLUTIONS AND PROTEIN DENATURATION

The formation of protein-containing condensed phases (crystals, oligomers, other solid aggregates, as well as dense liquids and gels), including membraneless micro and nano-phases, plays an important role in the functional activity of proteins in the cytoplasm of a living cell, presents a significant aspect of protein studies and biotechnologies, and causes various pathologies in a living body. Numerous phenomena bound to the arising of the folding intermediates of protein molecules do not appear to have been thermodynamically defined so far. This reduces the predictive power of the phase diagrams of protein solution states used to describe the state of the protein molecule in various physiological and biotechnological conditions. This paper is aimed at examining the relationship of liquid-liquid (L–L) type phase transitions of globular protein solutions with the phenomena of thermal and cold denaturation. We have shown that the analysis of phase diagram isobars in pressure-temperature and temperature-entropy coordinates allows predicting the new phase states formed by folding intermediates in protein dispersion. They are in metastable equilibrium with the macroscopic phase formed by native and denatured forms of protein molecules. Thermodynamic equilibrium is established due to the formation of microscale phases containing folding intermediates. They are stabilized by the capillary effect. This ensures the equality of the chemical potentials of all protein molecules with the same external pressure acting on the dispersion, which is a necessary condition for the stability of the system. The intermediates take the basic configuration outside the denaturation temperature range, and the L–L phase transition occurs, since there are no longer reasons for phase separation. This allows us to conclude that the metastable native protein – intermediate and denatured protein – intermediate phase equilibria have properties of L–L type equilibrium in the range of both low and high temperatures, and to explain the presence of such equilibria in the region of first-order phase transitions.

Key words: phase diagrams of protein solution; thermal and cold denaturation of protein; binodal; protein folding intermediates; phase transitions; capillary pressure.

Введение

Способность цитоплазмы в определенных условиях образовывать микроскопические фазы – органеллы, не ограниченные липидными мембранами или иными мембранными структурами [Human et al., 2014; Shin, Brangwynne, 2017], привлекает в последние годы все более пристальное внимание. Это обусловлено как накопившимися свидетельствами существования таких фаз, представленными в работах школы Насонова [Александров, 1985] и Линга [2008], так и их важной биологической ролью в осуществлении внутриклеточных транспортных, регуляторных, структурных функций [Matveev, 2005; Yewdall et al., 2018]. Параллельно этим работам и независимо от них шло изучение фазовых переходов (ФП) типа жидкость-жидкость (L–L) в дисперсиях белков [Asherie, 2004; Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012]. Эти ФП проявляются образованием микроскопических и/или наноразмерных капель (фаз) белка с концентрацией молекул большей, чем средняя по объему, то есть более плотных, чем окружающая дисперсия. На фазовой диаграмме (ФД) состояний белкового раствора эти образования возникают в состояниях, отображаемых

точками в области линии бинодали – кривой, разделяющей области устойчивого и неустойчивого (метастабильного) равновесия дисперсии [Yaminsky et al., 2002; Gillespie et al., 2014]. Были выяснены закономерности многоступенчатой нуклеации [Vorontsova et al., 2015], внесшие значительный вклад в понимание механизмов кристаллизации белка [Gebauer et al., 2014]. Накопленные знания о механизмах ФП типа L–L могут служить основой для описания и моделирования фазовых явлений в цитоплазме. Но для этого необходимо изучить взаимосвязь между ФП и структурно-конформационными изменениями в макромолекулах белков.

Взаимодействие глобулярных белков в растворе достаточно хорошо описывается в рамках представления о твердых сферах с короткодействующим потенциалом притяжения, действующего на коротких расстояниях около четверти диаметра частицы [Asherie, 2004]. Это объясняет существование ФП типа L–L и фазовых состояний, метастабильных по отношению к твердой фазе. При этом, однако, не учитывается множество других факторов, рассмотрение которых должно бы существенно дополнить картину взаимодействий между макромолекулами. Важнейшие среди них, но до сих пор

почти не принимавшиеся во внимание – это конформационное состояние молекулы белка и его роль в ФП, наличие «горячих» участков, обеспечивающих анизотропное взаимодействие [Lomakin et al., 1999].

Структурно-динамическое состояние белковых молекул в значительной степени определяется температурой. Важнейшими с этой точки зрения являются диапазоны тепловой и холодной денатурации и соответствующие структурно-динамические состояния белка (состояние D – тепловая денатурация и состояние D* – холодная денатурация). В интервале между ними состояние молекул белка описывается как нативное (состояние N), если белок не принадлежит к классу белков с внутренне неупорядоченной структурой (intrinsically disordered proteins, IDP). Сами же денатурационные переходы происходят по типу фазовых переходов 1-го рода [Финкельштейн, 2002]. Вместе с тем при приближении к температуре денатурации с любой стороны в дисперсии могут наблюдаться молекулы белка в состоянии с частично развернутой структурой – метастабильные интермедиаты сворачивания. В высокотемпературной области они наиболее известны как расплавленная и предрасплавленная глобула. Структура первой – ближе к состоянию N, а структура второй – к состоянию D [Bian, Ji, 2014]. Мольная доля интермедиатов может быть достаточно высока (до 0,4). Это позволяет регистрировать их экспериментально в физиологических условиях наряду с N и D состояниями [Nakamura et al., 2007] путем подбора условий (рН, солевой состав), в которых они приобретают относительную устойчивость или метастабильность по отношению к N и D. Химические потенциалы интермедиатов в таких равновесных состояниях и молекул в N и D состояниях в смеси должны быть равны [Рожков, Горюнов, 2017]. Это возможно, если интермедиаты способны организоваться в отдельные микрофазы – капли или пузыри, с концентрацией белка большей или меньшей, чем средняя по объему, соответственно. За счет дополнительного капиллярного (лапласова) давления в таких микрофазах химический потенциал интермедиатов μ_i может сравняться с таковым для N и D состояний:

$$\mu_i(P \pm \Delta P) = \mu_N(P) = \mu_D(P).$$

При этом внешнее давление P для всех фаз раствора может оставаться одинаковым. Теоретический анализ роли давления и температуры {PT} на конформационное состояние молекул белка часто проводится на основе эллиптической фазовой диаграммы (ФД)

Тамманна в форме скошенного эллипсоида. Такая диаграмма используется для описания самых разных физических явлений, сопряженных с реэнтрантными фазовыми переходами в многокомпонентных системах [Johari, 2001; Heremans, 2005]. Ранее нами было показано [Рожков, Горюнов, 2017], что ФД в координатах давление – температура {PT} может быть преобразована в координаты температура – энтропия {TS}. Это позволяет выявлять новые фазы раствора белка, которые не проявляются в системе на обычной ФД в координатах {TP}. ФД дисперсий глобулярных белков в координатах {PT} хорошо описывает разнообразные экспериментальные результаты, что многократно подтверждено работами, в которых в качестве параметра использовалось давление [Dave, Gruebele, 2015]. В то же время поведение белков с внутренне неупорядоченной структурой, интермедиатов сворачивания, олигомеров и агрегатов белка до сих пор не описано ФД такого типа сколько-нибудь полно [Badasyan et al., 2015]. Роль же капиллярных эффектов, создающих внутреннее давление в микрофазах, до сих пор рассматривалась лишь по отношению к ядрам нуклеации [Cacciuto, Frenkel, 2005].

Цель работы состояла в том, чтобы показать наличие взаимосвязи между процессами денатурации белка и фазовыми переходами типа L–L белкового раствора, между интермедиатами и состояниями N и D белковых молекул во всем диапазоне существования раствора глобулярного белка между температурами тепловой и холодной денатурации. Для этого использовали эллиптическую ФД в координатах {TS}, трансформированную из ФД {PT} путем изобарических сечений. На этой основе провели качественный термодинамический анализ возможных фазовых состояний в области тепловой и холодной денатурации с учетом представления об интермедиатах сворачивания.

Фазовые диаграммы белковых дисперсий

ФД в координатах температура – давление

На рис. 1 схематически представлена диаграмма Тамманна, отражающая тепловую, холодную и вызываемую давлением денатурацию белков. Линия эллипса образована точками, в которых выполняется условие $\Delta G_N^D = G^D - G^N = 0$, что соответствует ФП 1-го рода, в данном случае – N↔D. Важными элементами этой ФД являются «нейтральные линии», соединяющие точки, в которых выполняются

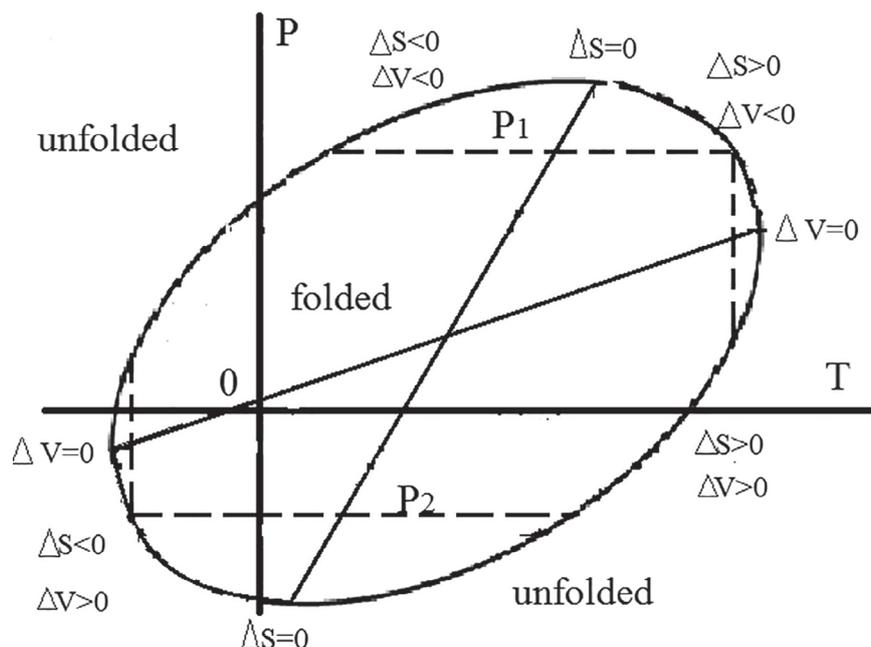


Рис. 1. Схематическое представление эллиптической фазовой диаграммы состояний белкового раствора в координатах давление P – температура T {PT}. P_1 и P_2 – сечения эллипса изобарами, используемые для анализа. Вдоль кривой эллипса указаны значения объема ΔV и энтропии ΔS в различных точках и участках кривой. Внутри эллипса состояние белка свернутое, снаружи – развернутое

Fig. 1. Schematic presentation of the elliptic phase diagram of protein solution states in pressure P – temperature T {PT} coordinates. P_1 and P_2 are the sections of the ellipse by isobars used for analysis. The values of volume ΔV and entropy ΔS are indicated at various points and sections along the ellipse curve. The structure of the protein corresponds to folded state inside the ellipse, and it is unfolded outside the ellipse

условия $\Delta S_N^D = S^D - S^N = 0$ и $\Delta V_N^D = V^D - V^N = 0$. Точки $\Delta S_N^D = 0$ соответствуют температурам, при которых N \leftrightarrow D переход происходит при минимальном и максимальном давлении, а $\Delta V_N^D = 0$ – при крайних температурах. На дугах эллипса между этими точками ΔS_N^D и ΔV_N^D не равны нулю. Сечения эллипса изобарами P_1 и P_2 показывают, что $dP/dT = 0$ в точке, где $\Delta S_N^D = 0$, и $dP/dT \rightarrow \infty$ в точке $\Delta V_N^D = 0$. Однако области, где $dP/dT < 0$ в верхней и нижней части эллипса, до сих пор не имели объяснения в рамках механизма сворачивания (фолдинга) белка [Meersman et al., 2006].

ФД в координатах температура – концентрация

Классические варианты ФД для концентрированных растворов глобулярного белка [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012] используются для отображения фазовых равновесий и ФП таких типов, как жидкость – твердое тело (L–S), жидкость – метастабильная плотная жидкость (L–L) с критической точкой, а также золь – гель.

ФД позволяют считать, что в сверхкритической области могут образовываться мезоскопические динамические кластеры белка и олигомеры, хотя природа этого процесса еще не вполне понятна [Vekilov, 2012].

До недавнего времени теоретический анализ с использованием фазовых диаграмм проводился преимущественно для белковых растворов с верхней критической температурой растворения (ВКТР) и нормальной растворимостью [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012]. Однако экспериментальные исследования, направленные на конструирование ФД, свидетельствуют, что одна часть белков образует растворы с ВКТР, а другая – с нижней критической температурой растворения (НКТР) [Grouazel et al., 2006]. Имеются экспериментальные данные, в частности данные по альбумину в присутствии полимеров [Wang, Annunziata, 2007], о том, что один и тот же белок может образовать растворы как с ВКТР, так и с НКТР в зависимости от условий эксперимента. Ранее мы обосновали такую возможность теоретически [Рождков, Горюнов, 2017].

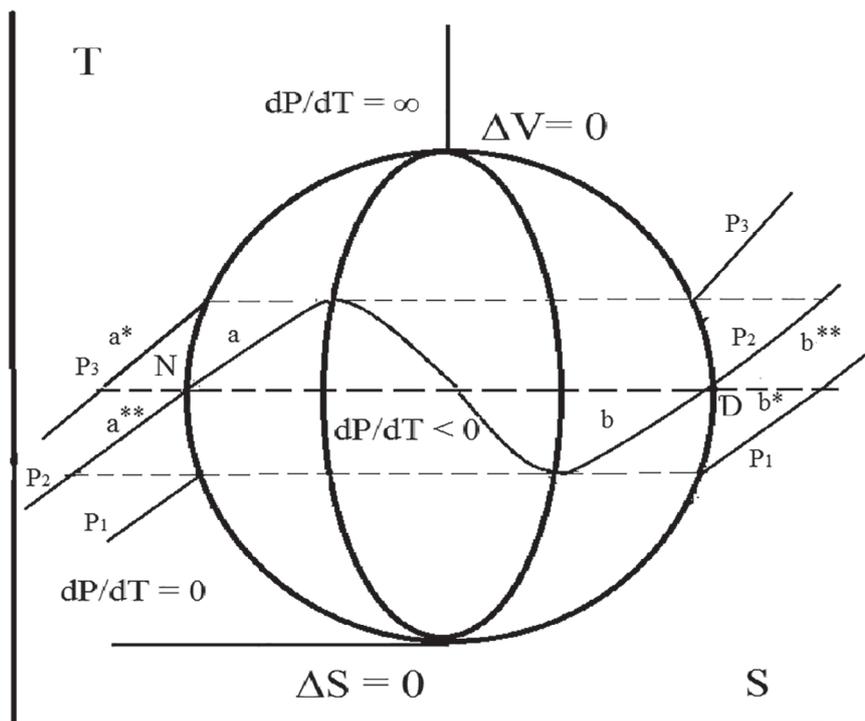


Рис. 2. Фазовая диаграмма (ФД) состояний белкового раствора в координатах температура – энтропия {TS}, объясняющая существование между точками $\Delta S_N^D = 0$ и $\Delta V_N^D = 0$ на эллиптической ФД (рис. 1) области $dP/dT < 0$ в диапазоне повышенных температур и давлений. Линии изобар P_1, P_2, P_3 соответствуют давлению, возрастающим от P_1 к P_3 ; внешний и внутренний эллипсы – линии бинадали и спинодали соответственно

Fig. 2. Phase diagram (PD) of protein solution states in temperature T – entropy S {TS} coordinates, explaining the presence of the zone $dP/dT < 0$ between the points $\Delta S_N^D = 0$ and $\Delta V_N^D = 0$ on the elliptic PD (Fig. 1) in the higher temperature and pressure range. The isobar lines P_1, P_2, P_3 correspond to the pressures that rise from P_1 to P_2 ; the outer and inner ellipses are binodal and spinodal lines respectively

Анализ ФД в координатах температура – энтропия

Бинадаль и спинадаль для интермедиатов белка в высокотемпературной области

Рассмотрим часть эллиптической ФД белкового раствора (рис. 1), ограниченную точками $\Delta S_N^D = 0$ и $\Delta V_N^D = 0$, в диапазоне высоких температур и давлений, где $dP/dT < 0$, а $\Delta S_N^D > 0$. На ФД в координатах температура – энтропия {TS} (рис. 2) соответствующая часть (дуга) эллипса может быть представлена следующим образом.

На изобаре P_2 показан фазовый переход $N \leftrightarrow D$ 1 рода, сопровождающийся скачком энтропии. При этом то, что отрезки a и b заходят в область бинадали (внешний эллипс), отражает возможность существования метастабильных состояний белка типа «перегретого» нативного (расплавленная глобула) или «переохлажденного» денатурированного (предрас-

плавленная глобула) при давлении P_2 . Будем считать их интермедиатами сворачивания. Для их возникновения переход $N \leftrightarrow D$ не обязателен. Они могут существовать в равновесии с молекулами белка в состояниях N и D, если изолированы от них в отдельные микроскопические фазы. В них интермедиаты будут находиться под следующим давлением:

$$P_3 = P_2 + 2\sigma/R_1 \quad (1)$$

и

$$P_1 = P_2 - 2\sigma/R_2 \quad (2)$$

В первом случае основная фаза, окружающая микрофазы, будет представлена молекулами в состоянии N (давление P_2 , отрезок a^{**}), и в ней будут находиться микрофазы с молекулами белка, близкими к «перегретому» состоянию N. Давление в микрофазах – P_3 (отрезок a^*). Во втором случае основная фаза содержит молекулы белка в состоянии D (давление P_2 , отрезок b^{**}), и в ней – микрофазы с молекулами

белка в состоянии, близком к «переохлажденному» состоянию D, под давлением P_1 (отрезок b^*). Тогда может выполняться условие:

$$\mu(N) = \mu(D) = \mu(P_3) = \mu(P_1) \quad (3)$$

при внешнем $P_2 = \text{const}$, $T = \text{const}$. Знак лапласова давления зависит от концентрации интермедиатов в микрофазе в сравнении с основной фазой. Потенциал взаимодействия между макромолекулами в микрофазах имеет в этой связи определяющее значение. Потенциал притяжения соответствует более плотной с точки зрения концентрации макромолекул микрофазе. Здесь из-за взаимодействия белок-белок макромолекулы менее гидратированы, чем в основной фазе. В этом случае объемная плотность самих молекул воды в микрофазе меньше, чем в основной фазе. Моделью такого состояния может служить пузырек пара в жидкости. Он может оставаться в равновесии с жидкостью, если давление Лапласа (отрицательное) компенсирует внешнее давление когезионных сил жидкости. Потенциал отталкивания соответствует менее плотной с точки зрения концентрации макромолекул, но более плотной (гидратированной) с точки зрения содержания воды микрофазе. Моделью этого состояния может служить капля жидкости в паре. Лапласово давление (положительное) будет направлено внутрь капли, препятствуя испарению.

Для молекул лизоцима показано, что вблизи фазового перехода $N \leftrightarrow D$ наряду с молекулами белка в состояниях N и D регистрируются два интермедиата белка. В случае других ферментов регистрируется либо от одного до трех интермедиатов, либо их полное отсутствие [Bian, Ji, 2014]. Вероятно, это зависит от возможности образования микрофазы определенного размера в данных условиях, что связано с конечным числом интермедиатов и их удельной поверхностной энергией. При изучении процессов агрегации лизоцима было обнаружено, что в денатурационном интервале температур белок образует криволинейные фибриллы, олигомеры, мономеры, жесткие фибриллы и преципитат. Если мономеры и жесткие фибриллы являются равновесными состояниями, то олигомеры и криволинейные фибриллы – метастабильные образования [Miti et al., 2015]. В таких асимметричных молекулярных системах, как криволинейные фибриллы, второй вириальный коэффициент положителен. Это позволяет предположить, что фибриллы формируют микроскопические фазы с потенциалом отталкивания. Наличие же преципитата свидетельствует о том, что имеет место также спиноподобный распад.

О возможном наличии равновесия интермедиатов с основными фазами раствора можно судить и непосредственно по рис. 1. Пусть P_0 – внешнее давление (атмосферное), при котором находится раствор белка. Пересечения изобары с дугами эллипса при низких и высоких температурах со стороны фазы N соответствуют $N \leftrightarrow D$ фазовым переходам. Однако изотермы для фазы N при пересечении с дугами эллипса при других давлениях (пунктир на рис. 1) попадают в диапазон температур и давлений, соответствующих условию $dP/dT < 0$. Это отвечает условию равновесия основной фазы раствора, находящейся под давлением P_0 , с микрофазой интермедиатов, находящейся также под давлением Лапласа. Но если в области высоких температур давление Лапласа положительно, то в области низких температур – отрицательно. Отрицательное давление Лапласа сопряжено с наличием короткодействующего потенциала притяжения между молекулами белка. С другой стороны, наличие такого потенциала обеспечивает фазовые переходы типа L–L для систем с ВКТП.

Уменьшение числа интермедиатов с понижением температуры (или повышением температуры для систем с отрицательным давлением Лапласа, горизонтальные пунктирные изобары на рис. 1) приводит к тому, что эти метастабильные фазы постепенно исчезают и остается основная фаза из N-молекул. Это равносильно критическому фазовому переходу типа L–L с НКТП и ВКТП соответственно.

Продолжение изобар P_1 в сторону более низких температур на рис. 1 показывает, что $N \leftrightarrow D$ переход происходит без участия интермедиатов, так как здесь $dP/dT > 0$. Вместе с тем состояния D молекул могут существовать в диапазоне физиологических температур, что характерно для молекул белков с внутренне неупорядоченной структурой.

Биноподаль и спиноподаль для интермедиатов белка в низкотемпературной области

Аналогично можно рассмотреть и часть эллиптической ФД, где $dP/dT < 0$, с той разницей, что здесь $\Delta S_N^D < 0$. В этом случае состояния D будут находиться слева по шкале энтропии, а состояния N – справа. Кроме того, точки $\Delta S_N^D = 0$ окажутся в нижней части шкалы температур, а $\Delta V_N^D = 0$ – в верхней. Все это означает, что интермедиаты молекул белка в фазе N будут находиться в более плотном состоянии под действием потенциала притяжения. Это согласуется с данными теоретических и экспериментальных исследований фазовых переходов типа L–L в белковых системах с ВКТП.

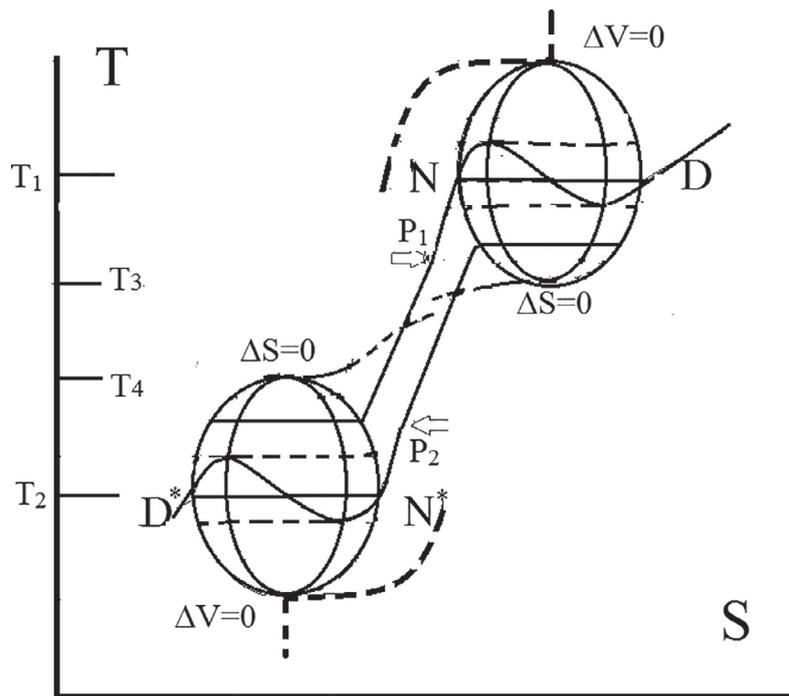


Рис. 3. Схематическое представление фазовой диаграммы состояний белкового раствора в координатах температура – энтропия {TS} в диапазоне между температурами холодной D* и тепловой D денатурации. N* и N низко- и высокотемпературные конформеры нативного белка, ΔV и ΔS – изменения объема и энтропии молекул белка соответственно P₁ и P₂-изобары.

Fig. 3. Schematic presentation of the phase diagram of protein solution states in temperature T – entropy S {TS} coordinates in the range between cold D* and thermal D denaturation temperatures. N* and N are the low and high- temperature conformers of native protein, ΔV and ΔS are the volume and entropy changes of protein molecules, P₁ and P₂ are isobars

Представленные рассуждения предлагают лишь вероятный вариант образования фаз, сформированных интермедиатами, поскольку для образования микрофаз интермедиатов определенного радиуса необходимы соответствующие условия. Например, фаза интермедиата с повышенным давлением (ур. 1) будет стабильна, если радиус флуктуации концентрации вещества достигнет значения ур. 2. В терминах химических потенциалов [Базаров, 1991]

$$R_{cr.} = 2\sigma V_1 / (\mu_1 - \mu_2), \quad (4)$$

где μ_1 и μ_2 – химические потенциалы интермедиата и нативной молекулы соответственно. Чем меньше их разность, тем больше должен быть радиус зародыша, чтобы образование фаз по компенсационному механизму [Рожков, 2001; Rozhkov, 2004] было энергетически выгодно. Поскольку это связано с удельной поверхностной энергией, то наличие в дисперсии поверхностно активных веществ может оказывать существенное влияние на процессы фазообразования.

Гипотетическая фазовая диаграмма в координатах температура – энтропия во всем диапазоне температур существования белкового раствора

На рис. 3 представлена гипотетическая фазовая диаграмма в координатах температура – энтропия, охватывающая весь диапазон изменения термодинамических переменных P и T (рис. 1), т. е. весь диапазон существования белкового раствора между температурами тепловой и холодной денатурации. Две дуги эллипса, где $dP/dT < 0$ и существуют интермедиаты, представлены двумя замкнутыми фигурами в координатах температура – энтропия, разделенными диапазоном температур, заключенным между точками $\Delta S_N^D = 0$ на рис. 1 внизу. В них $dP/dT = 0$. Нижней и верхней максимальным температурам соответствуют точки $\Delta V_N^D = 0$. В них $dP/dT = \infty$.

Состояния D* и N* при низких температурах и состояния D и N при высоких температурах разделены скачком энтропии и объема

как при ФП 1 рода. Структуры молекул белка, возникающие в результате тепловой и холодной денатурации, различаются по конформации, гидратации и объему [Adrover et al., 2012]. На рис. 3 они обозначены как D и D*. Спинодали (внутренние эллипсы) и бинадали (внешние эллипсы) соприкасаются в критических точках, где $\Delta S_N^D = 0$. В таких точках при температурах T_3 и T_4 различие между нативными молекулами и интермедиатами исчезает, и фазы, ранее находившиеся в равновесии, становятся тождественными. Этими точками обозначены критические фазовые переходные состояния. Между ними располагается закритическая область ФД раствора белка [Rozhkov, Goryunov, 2014]. Этой области соответствуют состояния раствора макроскопически однородного, но имеющего пониженную термодинамическую устойчивость. При переходе в закритические состояния раствор вначале становится однородным и лишь затем утрачивает свойства двухфазной системы. Поэтому в таких системах могут быть обнаружены динамические кластеры белка, имеющего конформацию интермедиатов. Кластеры имеют размер около 100 нм и окружены мономерами белка в преимущественно нативном состоянии.

Непрерывные фазовые переходы

Белок в нативном состоянии N также может быть представлен двумя конформерами: N и N* [Nakamura et al., 2007; Bian et al., 2014]. Изменение мольной доли этих конформеров с температурой, вероятно, может быть описано как непрерывный фазовый переход и поэтому должно быть учтено на ФД (рис. 1). В области пересечения «нейтральных» линий $\Delta V_N^D = 0$, $\Delta S_N^D = 0$, и поэтому $\Delta S/\Delta V = 0/0$, что противоречит уравнению Клапейрона – Клаузиуса для ФП 1 рода. В таком случае новая фаза возникает не в результате микроскопических флуктуаций, а в результате изменения параметра порядка и симметрии системы [Базаров, 1991].

Заключение

Таким образом, использование ФД раствора глобулярного белка в координатах температура – энтропия {TS}, полученной путем анализа изобарических сечений ФД в координатах давление – температура {PT}, позволило показать сопряженность метастабильных и нестабильных состояний раствора с образованием в том же растворе интермедиатов сворачивания белка. Обосновано предположение о том, что интермедиаты группируются в отдельные

микрофазы, которые стабилизируются за счет капиллярного эффекта. Капиллярное давление балансирует химический потенциал интермедиатов так, что они могут находиться в метастабильном равновесии с молекулами денатурированного и нативного белка в процессе ФП 1 рода. При этом внешнее давление остается одинаковым для всех фаз. Такой подход позволяет также показать, что метастабильные фазовые равновесия нативный белок – интермедиат и денатурированный белок – интермедиат имеют признаки равновесия типа L–L в области как низких, так и повышенных температур, и объяснить их возникновение вдали от области ФП 1 рода. При переходе через линию критических состояний из области как низких, так и высоких температур в область промежуточных температур возникают мезофазные состояния раствора нативного белка. В этих состояниях раствор макроскопически однороден, но содержит динамические нанокластеры из интермедиатов белка. В дальнейшем использование трансформации ФД, в частности в координаты температура – плотность упаковки (структурная координата), может позволить отобразить полиморфные состояния белка в растворе и объяснить механизм их возникновения.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0044).

Литература

- Александров В. Я. Реактивность клеток и белки. Л.: Наука, 1985. 318 с.
- Базаров И. П. Термодинамика. М.: Высшая школа, 1991. 376 с.
- Линг Г. Физическая теория живой клетки: Незамеченная революция. СПб.: Наука, 2008. 376 с.
- Рожков С. П. Трехкомпонентная система вода-биополимер-ионы как модель молекулярных механизмов осмотического гомеостаза // Биофизика. 2001. Т. 46, № 1. С. 53–59.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Стабильные, метастабильные и закритическая фазы в растворах глобулярных белков между верхней и нижней температурами их денатурации // Биофизика. 2017. Т. 62, вып. 4. С. 665–673. doi: 10.1134/S0006350917040182
- Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. М.: КДУ, 2002. 376 с.
- Adrover M., Martorell G., Martin S. R., Urosev D., Konarev P. V., Svergun D. I., Daura X., Temussi P., Pastore A. The role of hydration in protein stability: comparison of the cold and heat unfolded states of Yfh1 // J. Mol. Biol. 2012. Vol. 417, no. 5. P. 413–424. doi: 10.1016/j.jmb.2012.02.00

Asherie N. Protein crystallization and phase diagrams // *Methods*. 2004. Vol. 34, no. 3. P. 266–272. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.028

Badasyan A., Mamasakhlisov Y. Sh., Podgornik R., Morozov V. Solvent effects in the helix-coil transition model can explain the unusual biophysics of intrinsically disordered proteins // *J. Chem. Phys.* 2015. Vol. 143, no. 1. P. 14–102. doi: 10.1063/1.492329

Bian L., Wua D., Hub W. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography // *Biomed. Chromatogr.* 2014. Vol. 28, no. 2. P. 295–301. doi: 10.1002/bmc.3020

Bian L., Ji X. Distribution, transition and thermodynamic stability of protein conformations in the denaturant-induced unfolding of proteins // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 3. P. e91129. doi: 10.1371/journal.pone.0091129

Cacciuto A., Frenkel D. Stress inside critical nuclei // *J. Phys. Chem. B*. 2005. Vol. 109, no. 14. P. 6587–6594. doi: 10.1021/jp0456483

Dave K., Gruebele M. Fast-folding proteins under stress // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72, no. 22. P. 4273–4285. doi: 10.1007/s00018-015-2002-3

Dumetz A. C., Chockla A. M., Kaler E. W., Lenhoff A. M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid – liquid phase separation, gels, and aggregates // *Biophys. J.* 2008. Vol. 94, no. 2. P. 570–583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152

Gebauer D., Kellermeier M., Gale J. D., Bergström L., Cölfen H. Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, no. 7. P. 2348–2371. doi: 10.1039/c3cs60451a

Gillespie C. M., Asthagiri D., Lenhoff A. M. Polymorphic protein crystal growth: influence of hydration and ions in glucose isomerase // *Cryst. Growth Des.* 2014. Vol. 14, no. 1. P. 46–57. doi: 10.1021/cg401063b

Grouazel S., Bonnete F., Astier J. P., Ferte N., Perez J., Veessler S. Exploring bovine pancreatic trypsin inhibitor phase transitions // *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110, no. 39. P. 19664–19670. doi: 10.1021/jp0627123

Heremans K. Protein dynamics: Hydration and cavities. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005. Vol. 38, no. 8. P. 1157–1165. doi: 10.1590/S0100-879X2005000800002

Hyman A. A., Weber C. A., Julicher F. Liquid-liquid phase separation in biology // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2014. Vol. 30, no. 1. P. 39–58. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013325

Johari G. P. The Tammann phase boundary, exothermic disordering and the entropy contribution change on phase transformation // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001. Vol. 3, no. 12. P. 2483–2487. doi: 10.1039/B100246P

Lomakin A., Asherie N., Benedek G. B. Aeolotopic interactions of globular proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96, no. 17. P. 9465–9468.

Matveev V. V. Protoreaction of protoplasm // *Cell Mol. Biol.* 2005. Vol. 51, no. 8. P. 715–723.

Meersman F., Smeller L., Heremans K. Protein stability and dynamics in the pressure – temperature plane // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. Vol. 1764, no. 3. P. 346–354. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.11.019

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases // *Biomacromolecules*. 2015. Vol. 16, no. 1. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r

Nakamura S., Baba T., Kidokoro S. A molten globule-like intermediate state detected in the thermal transition of cytochrome c under low salt concentration // *Biophysical Chem.* 2007. Vol. 127, no. 1–2. P. 103–112. doi: 10.1016/j.bpc.2007.01.002

Rozhkov S. P. Phase transitions and precrystallization processes in a water-protein-electrolyte system // *J. Cryst. Growth*. 2004. Vol. 273, no. 1–2. P. 266–279. doi: 10.1016/j.jcrysgr.2004.08.021

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions // *J. Supercrit. Fluids*. 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028

Shin Y., Brangwynne C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease // *Science*. 2017. Vol. 357, no. 6357. P. 1253. doi: 10.1126/science.aaf4382

Vekilov P. G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions // *J. Phys. Condens. Matter*. 2012. Vol. 24, no. 19. P. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101

Vorontsova M. A., Maes D., Vekilov P. G. Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals // *Faraday Discussion*. 2015. Vol. 179. P. 27–40. doi: 10.1039/c4fd00217b

Wang Y., Annunziata O. Comparison between protein-polyethylene glycol (PEG) interactions and the effect of PEG on protein-protein interactions using the liquid-liquid phase transition // *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111, no. 5. P. 1222–1230. doi: 10.1021/jp065608u

Yaminsky I. V., Gvozdev N. V., Sil'nikova M. I., Rashkovich L. N. Atomic force microscopy study of lysozyme crystallization // *Crystallography Reports*. 2002. Vol. 47, no. 1. P. 149–158. doi: 10.1134/1.1529969

Yewdall N. A., Mason A. F., van Hest J. C. M. The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells // *Interface Focus*. 2018. Vol. 8, no. 5. P. 20180023. doi: 10.1098/rsfs.2018.0023

Поступила в редакцию 20.03.2019

References

Aleksandrov V. Ya. Reaktivnost' kletok i belki [Cell reactivity and proteins]. Leningrad: Nauka, 1985. 318 p.

Bazarov I. P. Termodinamika [Thermodynamics]. Moscow: Vysshaya shkola, 1991. 376 p.

Finkelstein A. V., Ptitsyn O. B. Protein physics. N. Y.: Academic Press, 2002. 354 p. doi: 10.1002/cbf.1064

Ling N. G. Life at the cell and below-cell level: The hidden history of a fundamental revolution in biology. N. Y.: Pacific Press, 2001. 373 p.

Rozhkov S. P. Trekhkomponentnaya sistema voda-biopolimer-iony kak model' molekulyarnykh mekhanizmov osmoticheskogo gomeostaza [Three-component system water-biopolymer-ions as a model for

the molecular mechanisms of osmotic homeostasis]. *Biofizika* [Biophysics]. 2001. Vol. 46, no. 1. P. 53–59.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Stabil'nye, metastabil'nye i zakriticheskaya fazy v rastvorakh globulyarnykh belkov mezhdru verkhnei i nizhnei temperaturami ikh denaturatsii [Stable, metastable, and supercritical phases in solutions of globular proteins between upper and lower denaturation temperatures]. *Biofizika* [Biophysics]. 2017. Vol. 62, no. 4. P. 665–673. doi: 10.1134/S0006350917040182

Adrover M., Martorell G., Martin S. R., Urosev D., Konarev P. V., Svergun D. I., Daura X., Temussi P., Pastore A. The role of hydration in protein stability: comparison of the cold and heat unfolded states of Yfh1. *J. Mol. Biol.* 2012. Vol. 417, no. 5. P. 413–424. doi: 10.1016/j.jmb.2012.02.002

Asherie N. Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*. 2004. Vol. 34, no. 3. P. 266–272. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.028

Badasyan A., Mamasakhlisov Y. Sh., Podgornik R., Morozov V. Solvent effects in the helix-coil transition model can explain the unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *J. Chem. Phys.* 2015. Vol. 143, no. 1. P. 14–102. doi: 10.1063/1.4923292

Bian L, Wua D., Hub W. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2014. Vol. 28, no. 2. P. 295–301. doi: 10.1002/bmc.3020

Bian L., Ji X. Distribution, transition and thermodynamic stability of protein conformations in the denaturant-induced unfolding of proteins. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 3. P. e91129. doi: 10.1371/journal.pone.0091129

Cacciuto A., Frenkel D. Stress inside critical nuclei. *J. Phys. Chem. B*. 2005. Vol. 109, no. 14. P. 6587–6594. doi: 10.1021/jp0456483

Dave K., Grubele M. Fast-folding proteins under stress. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72, no. 22. P. 4273–4285. doi: 10.1007/s00018-015-2002-3

Dumetz A. C., Chockla A. M., Kaler E. W., Lenhoff A. M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid – liquid phase separation, gels, and aggregates. *Biophys. J.* 2008. Vol. 94, no. 2. P. 570–583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152

Gebauer D., Kellermeier M., Gale J. D., Bergström L., Cölfen H. Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallization. *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, no. 7. P. 2348–2371. doi: 10.1039/c3cs60451a

Gillespie C. M., Asthagiri D., Lenhoff A. M. Polymorphic protein crystal growth: influence of hydration and ions in glucose isomerase. *Cryst. Growth Des.* 2014. Vol. 14, no. 1. P. 46–57. doi: 10.1021/cg401063b

Grouazel S., Bonnete F., Astier J. P., Ferte N., Perez J., Veessler S. Exploring bovine pancreatic trypsin inhibitor phase transitions. *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110, no. 39. P. 19664–19670. doi: 10.1021/jp0627123

Heremans K. Protein dynamics: Hydration and cavities. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005. Vol. 38, no. 8. P. 1157–1165. doi: 10.1590/S0100-879X2005000800002

Hyman A. A., Weber C. A., Julicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*

2014. Vol. 30, no. 1. P. 39–58. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013325

Johari G. P. The Tammann phase boundary, exothermic disordering and the entropy contribution change on phase transformation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001. Vol. 3, no. 12. P. 2483–2487. doi: 10.1039/B100246P

Lomakin A., Asherie N., Benedek G. B. Aeolotopic interactions of globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96, no. 17. P. 9465–9468.

Matveev V. V. Protoreaction of protoplasm. *Cell Mol. Biology*. 2005. Vol. 51, no. 8. P. 715–723.

Meersman F., Smeller L., Heremans K. Protein stability and dynamics in the pressure – temperature plane. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. Vol. 1764, no. 3. P. 346–354. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.11.019

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. *Biomacromolecules*. 2015. Vol. 16, no. 1. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r

Nakamura S., Baba T., Kidokoro S. A molten globule-like intermediate state detected in the thermal transition of cytochrome c under low salt concentration. *Biophysical Chem.* 2007. Vol. 127, no. 1–2. P. 103–112. doi: 10.1016/j.bpc.2007.01.002

Rozhkov S. P. Phase transitions and precrystallization processes in a water-protein-electrolyte system. *J. Cryst. Growth*. 2004. Vol. 273, no. 1–2. P. 266–279. doi: 10.1016/j.jcrysgro.2004.08.021

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions. *J. Supercrit. Fluids*. 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028

Shin Y., Brangwynne C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. 2017. Vol. 357, no. 6357. P. 1253. doi: 10.1126/science.aaf4382

Vekilov P. G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions. *J. Phys. Condens. Matter*. 2012. Vol. 24, no. 19. P. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101

Vorontsova M. A., Maes D., Vekilov P. G. Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals. *Faraday Discussion*. 2015. Vol. 179. P. 27–40. doi: 10.1039/c4fd00217b

Wang Y., Annunziata O. Comparison between protein-polyethylene glycol (PEG) interactions and the effect of PEG on protein-protein interactions using the liquid-liquid phase transition. *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111, no. 5. P. 1222–1230. doi: 10.1021/jp065608u

Yaminsky I. V., Gvozdev N. V., Sil'nikova M. I., Rashkovich L. N. Atomic force microscopy study of lysozyme crystallization. *Crystallography Reports*. 2002. Vol. 47, no. 1. P. 149–158. doi: 10.1134/1.1529969

Yewdall N. A., Mason A. F., van Hest J. C. M. The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells. *Interface Focus*. 2018. Vol. 8, no. 5. P. 20180023. doi: 10.1098/rsfs.2018.0023

Received March 20, 2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: rozhkov@krc.karelia.ru

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф. -м. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 765264

CONTRIBUTORS:

Rozhkov, Sergei

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Goryunov, Andrei

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 765264