

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.3

### СОПРЯЖЕННОСТЬ КОНФОРМАЦИОННЫХ И ФАЗОВЫХ СОСТОЯНИЙ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В СОЛЕВЫХ РАСТВОРАХ ПО ДАННЫМ МЕТОДА ЭПР СПИНОВЫХ МЕТОК

С. П. Рожков, А. С. Горюнов, М. Ю. Крупнова

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

Использование сывороточных альбуминов (СА) в модельных системах при исследовании биологической активности химических соединений и наноматериалов, а также физико-химических, в частности фазовых, свойств биологических жидкостей, в том числе нуклеоплазмы и цитоплазмы живой клетки, требует более глубоких представлений о взаимосвязи конформационных (структурно-динамических) состояний белковых молекул с фазовыми состояниями белковых дисперсий в широком диапазоне температур и составов. Обычно используемые при изучении этой взаимосвязи совместное построение и анализ кривой стабильности белка и фазовых диаграмм белкового раствора существенно осложнены в случае сывороточного альбумина повышенной склонностью этого белка к агрегации. В настоящей работе для этих целей предлагается экспериментально-теоретический подход, основанный на применении электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых меток (малеимида-ТЕМПО и дихлортриазин-ТЕМПО), ковалентно связанных с молекулой белка и чувствительных к изменению как структурно-динамического состояния белковых молекул, так и фазового состояния белковых растворов (дисперсий). Представлены данные о характеристиках подвижности спин-меток (времени корреляции, термодинамических функциях, константе равновесия), отражающих состояние внутри- и межмолекулярных взаимодействий молекул СА человека. Показано, что переходы на температурных зависимостях этих характеристик от температуры и концентрации NaCl, CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, сахарозы, полиэтиленгликоля и тяжелой воды отражают взаимопревращения низко- и высокотемпературного конформеров белка и их агрегатов, а также фазовые переходы типа жидкость-жидкость, в том числе реентрантные. На основе полученных результатов предложена фазовая диаграмма дисперсии СА, описывающая фазовые переходы типа жидкость-жидкость вблизи температур холодной и тепловой денатурации с учетом роли нативных конформеров белка, их агрегатов и переходов между ними в области физиологических температур.

**Ключевые слова:** белковый раствор; электронный парамагнитный резонанс; взаимодействие белков с низко- и высокомолекулярными веществами; фазовая диаграмма.

## S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov, M. Yu. Krupnova. INTERRELATION OF SERUM ALBUMIN CONFORMATIONAL AND PHASE STATES IN SALT SOLUTIONS AS STUDIED BY EPR SPIN LABELING

The use of serum albumins (SA) in model systems in the study of the biological activity of chemical compounds and nanomaterials, as well as the physicochemical properties, in particular, phase properties of biological fluids, including the nucleoplasm and cytoplasm of living cells, requires a deeper understanding of the relationship of conformational (structural-dynamic) states of protein molecules with phase states of protein dispersions in a wide range of temperatures and compositions. The joint plotting and analysis of the protein stability curve and phase diagrams of protein solutions commonly used in the study of this relationship are significantly complicated by this protein's elevated tendency to aggregate. In this paper, an experimental-theoretical approach, based on the application of the electron spin resonance (ESR) of spin labels (maleimido-TEMPO and dichlorotriazine-TEMPO spin labels) covalently bound to the protein and sensitive to changes in both the structural-dynamic state of protein molecules and the phase state of protein dispersions, is proposed for studying this relationship. Data on the mobility characteristics of the spin labels (correlation times, state functions, equilibrium constants), indicating the state of intra- and intermolecular interactions of SA molecules, are presented. Transitions in temperature dependences of these characteristics on the temperature and concentration of NaCl, CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sucrose, polyethylene glycol, and heavy water have been shown to reflect the interconversions of protein conformers and their aggregates as well as liquid-liquid phase transitions, including those of a reentrant type. Based on the results, a phase diagram of the SA dispersion describing liquid-liquid phase transitions in the temperature range of cold and thermal denaturation and taking into account the role of native protein conformers, their aggregates and transitions between them in the physiological interval has been proposed.

**Key words:** protein solution; electron spin resonance; protein interactions with low- and high-molecular weight substances; phase diagram.

### Введение

Из всего многообразия белков сывороточные альбумины (СА) наиболее часто служат в качестве модельных объектов для анализа биологической активности химических соединений и наночастиц в различных областях биофизических исследований. К примеру, они используются в качестве сенсоров конформационных и фазовых изменений при взаимодействии биомолекул с наночастицами различной природы при образовании белковой короны [Treuel et al., 2014], для функционализации бионаноконъюгатов [Li et al., 2016], индукции и ингибирования процессов фибриллообразования [Zaman et al., 2014]. Это обусловлено как доступностью и дешевизной сывороточных альбуминов, так и относительной полнотой знания [Ландау, 1981; Peters, 1996] их конформационного состояния, межмолекулярного взаимодействия и фазового поведения в различных дисперсиях, моделирующих как состояние молекулярного краудинга, так и соответствующего микроокружения белков. Особое значение это приобретает в свете обнаруженных в последнее время способностей различного типа безмембранных органелл в цитоплазме к фазо-

вым переходам (ФП) типа жидкость-жидкость (L-L), участником которых обычно являются внутренне неупорядоченные белки [Dignon et al., 2019]. Хотя молекулярные механизмы таких переходов остаются во многом неизвестными [Shin, Brangwynne, 2017], установлено, что склонность к L-L переходам определяется термореактивным поведением аминокислотных остатков белковых цепей. Это позволяет проводить направленную разработку таких последовательностей с желаемыми свойствами по отношению к нижним (НКТП) и верхним (ВКТП) критическим температурам L-L переходов [Dignon et al., 2019].

Однако часто микроокружение обеспечивается солевым составом. При этом предполагается [Uversky et al., 2001], что потенциал связывания белков с ионами поливалентных металлов является важным фактором индуцированных металлом конформационных изменений белка, приводящих к появлению частично свернутых интермедиатов. Даже низкие концентрации некоторых металлов могут непосредственно вызывать образование фибрилл. В свою очередь, наличие специфических центров связывания ионов и температурные зависимости их эффективности определяются аминокислотной

последовательностью [Ma, Cui, 2006]. Недавно на основе анализа поведения кривых стабильности белка было установлено, что расположение в ряду Гоффмейстера анионов и катионов, обеспечивающих ион-специфические эффекты биомолекулярных реакций, также существенно зависит от температуры [Senske et al., 2016]. Таким образом, варьируя концентрации различных солей или pH растворов нативного глобулярного белка, можно менять зарядовое состояние белка и влиять на его внутреннюю неупорядоченность, тем самым регулируя положение L–L переходов на фазовой диаграмме. Так, было показано [Juarez et al., 2009a], что сывороточный альбумин человека (САЧ) при уменьшении pH и в присутствии солей при комнатных и повышенных температурах способен образовывать фибриллы, путь к формированию которых и их структура существенно зависят от микроокружения. Эта способность определяется повышенной склонностью альбумина к олигомеризации и агрегации в целом. При этом остается открытым вопрос о последовательности образования фибрилл: в один шаг непосредственно из раствора мономеров или в два шага через предварительное образование олигомеров [Juarez et al., 2009b; Auer et al., 2012].

Потенциальные возможности альбумина к образованию агрегатов и/или олигомеров, наличие фракций белка, отличающихся по типу и количеству переносимых низкомолекулярных соединений, обуславливает необходимость разработки более полной фазовой диаграммы (ФД) дисперсии СА, которая увязывала бы его структурно динамическое состояние с фазовыми свойствами (термодинамической устойчивостью) дисперсии [Zhang et al., 2006].

Мы полагаем, что ФП L–L сопряжены с денатурационными переходами, как тепловыми, так и холодowymi. При этом в состоянии кластеров (микрофаз) плотной жидкости [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012] оказываются метастабильные интермедиаты сворачивания типа расплавленной и/или предрасплавленной глобулы [Рожков, Горюнов, 2017, 2019]. Как правило, критическая температура высокотемпературного перехода (система с НКТР) снижается с ростом концентрации электролита [Matsarskaia et al., 2016, 2018], а критическая температура низкотемпературного перехода (система с ВКТР) сначала повышается в присутствии солей, а затем понижается, как это показано экспериментально для лизоцима [Grigsby et al., 2001] и теоретически для системы вода-белок-соль [Rozhkov, Goryunov, 2010, 2014]. Аналогичные явления наблюдаются и в присутствии водорастворимых полимеров

типа полиэтиленгликолей (ПЭГ) [Wang et al., 2014], которые часто используются для создания эффектов молекулярного краудинга.

Кластеры плотной жидкости содержат до тысячи молекул белка и возникают вблизи фазовой границы L–L переходов, являясь результатом баланса сил коллоидного взаимодействия: короткодействующего потенциала притяжения и дальнедействующего отталкивания [Vekilov, 2012]. В связи с этим общая задача расшифровки механизмов образования и стабилизации кластеров белков как фазовых явлений оказывается тесным образом сопряжена с проблемой белкового фолдинга и требует учета особенностей конформационного состояния молекул белков в физиологической области температур и составов белковых растворов. Как показано современными методами с использованием Ферстеровского переноса энергии [Aznauryan et al., 2013], наряду с молекулами белка в нативном состоянии в области физиологических температур всегда присутствует большая фракция белка в состоянии, близком к денатурированному. Вместе с тем нативное состояние является наиболее стабильным в этом диапазоне, что позволяет экспериментальным путем строить кривую стабильности белка [Sanfelice, Temussi, 2016; Alfano et al., 2017], которая представляет собой температурную зависимость разности свободной энергии между денатурированными и нативными молекулами  $\Delta G_N^D = G^D - G^N$ . Как следует из ее колоколообразной формы, полная дестабилизация нативных частиц происходит в двух нулевых точках  $\Delta G_N^D = 0$ , расположенных в области низких и высоких температур, а стабилизация (максимум  $\Delta G_N^D$ ) – в области физиологических температур. Присутствие любых агентов, (де)стабилизирующих структуру белка или воды в растворе, равно как и адсорбентов, в первую очередь будет влиять на форму кривой стабилизации, что дает возможность изучать и анализировать их активность [Alfano et al., 2017].

Одним из методов, которые позволяют параллельно изучать как конформационное состояние молекул, так и межмолекулярные взаимодействия и образование комплексов (ассоциатов) белковых молекул в растворе, является метод ЭПР спиновых меток и зондов [Лихтенштейн, 1974; Кузнецов, 1976; Метод..., 1979]. Конформационные и фазовые переходы молекул белка с ковалентно связанными спин-метками должны неизбежно сказываться на динамических и релаксационных характеристиках спин-меток, изменяющихся вслед за локальными изменениями микровязкости, удельной поверхностной энергии, диэлектрических

свойств среды. В настоящей работе использовался основанный на ЭПР спин-меток подход, который надежно зарекомендовал себя при изучении структурно-динамических свойств как белковых молекул, так и их комплексов (ассоциатов) [Рожков, Кяйвяряйнен, 1985; Rozhkov, Goryunov, 2000; Rozhkov, 2004].

Если молекула белка имеет лишь один центр связывания спиновой метки, как в случае спин-метки ТЕМПО-малеимид на САЧ, возникнет возможность, с одной стороны, рассчитать константу конформационного равновесия между состояниями микроокружения и соответствующие значения разности термодинамических функций этих состояний, а с другой – оценить изменения эффективного расстояния между молекулами белка, определяя среднее расстояние диполь-дипольного взаимодействия между спин-метками. Это позволяет наблюдать как за структурно-динамическим, так и за фазовым состоянием дисперсии молекул белка.

Если же молекула белка имеет несколько центров связывания спин-метки, как в случае ТЕМПО-дихлортриазина [Бондарев и др., 1988], открывается возможность регистрировать трансглобулярные структурные изменения, которые находят свое отражение в поведении кривой стабильности (температурной зависимости свободной энергии денатурации) макромолекул белка и ее изменений под действием физических и химических факторов.

На примере САЧ обсуждаются возможности метода для анализа стабильности белка в области физиологических температур, позволяющие проводить оценку изменения фазовых и конформационных состояний молекул белков, индуцируемых электролитами и другими компонентами раствора. При этом рассматриваются также некоторые особенности ФД состояния СА, поскольку в теоретическом плане одной из важных нерешенных проблем в протеомике является разработка глобальных ФД, которые учитывали бы всевозможные структуры и переходы между ними [Buell, 2017]. Поэтому цель настоящей работы – методом ЭПР спин-метки обнаружить изменения структурного состояния растворов САЧ, сопряженные с индуцируемыми солью изменениями конформационного состояния макромолекулы САЧ, как локального, так и трансглобулярного, и установить их взаимосвязь с фазовым состоянием раствора. Это позволит на основании полученных результатов, а также сложившихся к настоящему времени представлений о фазовых свойствах белковых систем ответить на более общий вопрос об особенностях ФД состояний растворов СА, в частности, о положении на ней областей стабильно-

сти конформеров и ассоциатов белка, а также о фазовых переходах между этими состояниями, включая L–L ФП.

## Материалы и методы

В работе использовались препараты лиофилизированного порошка необезжиренного (5-я фракция) САЧ и спиновые метки на основе ТЕМПО-малеимида производства компании Sigma-Aldrich, а также на основе ТЕМПО-дихлортриазина (2,2,6,6-тетраметил-N-1-оксипиперидин-4-аминодихлортриазин), синтезированная методом, описанным в [Жданов, 1981]. Фосфатный буфер (pH 7,3), в том числе содержащий 0,15 М NaCl, для раствора САЧ готовили с применением химически чистых реагентов. В работе также использовались тяжелая вода с атомной долей дейтерия 99,8 %, а также химически чистые сахара, полиэтиленгликоль ММ 40000 (ПЭГ-40), NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , NaOH, HCl. Все растворы приготовлены на ультрачистой дистиллированной, дегазированной и деионизованной воде (MilliQ). Растворы спин-меченого САЧ (САЧ-СМ) для ЭПР спектроскопии получены на основе 1 мМ исходного раствора в 0,01 М фосфатном буфере + 0,15 М NaCl (pH 7,3) путем разбавления до требуемой концентрации в объеме образца 100–300 мкл. Растворы с разным содержанием тяжелой воды получали путем добавления концентрированного раствора белка в буферные растворы с соответствующей концентрацией  $\text{D}_2\text{O}$ . pH растворов доводились до требуемой величины в растворах разного состава с использованием заготовленных кислых и щелочных 0,12 М фосфатных буферов. pH всех образцов тщательно контролировался с помощью калиброванного pH-микроэлектрода и pH-метра. Измерения в растворах, содержащих  $\text{D}_2\text{O}$ , проводились при pH, равном pH измеренному, чтобы гарантировать неизменность электростатического состояния макромолекул. Вязкость растворов сахарозы определяли с помощью рефрактометра ИРФ-22 и соответствующей номограммы. Вязкость растворов сахарозы с ПЭГ-40 определяли с использованием вискозиметра Оствальда.

Спектры ЭПР САЧ-СМ регистрировались на радиоспектрометре ЭПР X-диапазона Bruker EMX 6/1 с термостатируемой ячейкой резонатора ( $\pm 0,2^\circ\text{C}$ ) при амплитуде модуляции 1 Гс и СВЧ мощности 12,6 мВт во избежание насыщения и искажения сигнала. Условия экспериментов и модификация САЧ спиновыми метками подробно описаны ранее [Рожков, Кяйвяряйнен, 1985; Rozhkov, Goryunov, 2000;

Rozhkov, 2004]. Важной характеристикой получаемого спектра спин-метки в области медленных вращений является наличие двух хорошо разрешенных внешних экстремумов, обусловленных сверхтонким взаимодействием, и центральной компоненты за счет наложения различных составляющих сверхтонкой структуры. При этом спин-метка может иметь несколько центров связывания с белком (как в случае с меткой на основе ТЕМПО-дихлортриазина на IgG [Бондарев и др., 1988]) или один центр связывания (проксил-малеимид на альбумине [Pavićević et al., 2017]), но в обоих случаях содержать несколько компонент в спектре. Так, установлено, что двухкомпонентность спектра спин-метки ТЕМПО-малеимида обусловлена равновесием двух состояний структуры белка, в которых микровязкость и подвижность радикала существенно различаются [Wetzel et al., 1980]. Константа равновесия  $K$  определяется конформационными флуктуациями полости в структуре белка, где локализуется аминокислотный остаток Цис-34, с которым связывается спин-метка. Поскольку концентрация спинов (спин-меток) в каждом состоянии пропорциональна площади под соответствующей компонентой сигнала поглощения  $N \sim kI(\Delta H)^2$ , где  $k$  – константа, характеризующая форму линии,  $I$  и  $\Delta H$  – амплитуда и ширина широкой (A) и узкой (B) линий спектра соответственно [Пул, 1970; Rozhkov, Goryunov, 2000], то:

$$K_p^{\text{эф}} = I_0^A(\Delta H_0)_A^2 / I_0^B(\Delta H_0)_B^2, \quad (1)$$

где  $K_p^{\text{эф}}$  – эффективные значения  $K$ . Это позволяет рассчитать изменение эффективной энтропии  $\Delta S^{\text{эф}}$ , энтальпии  $\Delta H^{\text{эф}}$  и свободной энергии состояния спин-метки в полости.

Расчет времени корреляции диффузии спин-метки зависит от выбранной модели ее диффузии и отражает диффузию как самой спин-метки с частотой  $\nu_1 = \tau_R^{-1}$ , так и белковой глобулы с частотой  $\nu_2 = \tau_M^{-1}$ . В этом случае измеряемое время корреляции  $\tau^{\text{эф}} \sim \nu_1^{-1} + \nu_2^{-1}$  будет эффективным. Эффективное время корреляции  $\tau^{\text{эф}}$  рассчитывали по известной формуле [Кузнецов, 1976]:

$$\tau^{\text{эф}} = a(1 - S)^b 32/A_z.$$

Здесь  $S = A_z^*/A_z$ , где  $A_z$  – половина расстояния по полю между внешними экстремумами спектра, соответствующего условию предельно медленного вращения спин-метки, а  $A_z^*$  – та же величина для спектра исследуемой спин-метки. Параметры  $a$  и  $b$  определяются моделью вращения спин-метки и остаточной шириной индивидуальной линии спектра, и в рамках используемой нами модели (изотропная или

слабоанизотропная скачкообразная диффузия) их значения составляют  $a = 25,5 \cdot 10^{-14}$  Тл/с и  $b = -0,615$ . Такая модель диффузии выбрана потому, что характер вращения белка и метки совпадает [Кузнецов, 1976]. Если «скачки» самой метки могут быть обусловлены конформационными изменениями ее микроокружения, то «скачки» макромолекулы можно объяснить с учетом потенциала взаимодействия белок-белок. Лишь преодоление потенциального барьера взаимодействия «скачком» может обеспечить макромолекуле одновременно трансляционную диффузию и вращательную переориентацию:

$$\nu = (\tau^{\text{эф}})^{-1} = \tau_R^{-1} + \tau_M^{-1}. \quad (2)$$

Для изотропной модели движения спин-метки был предложен способ [Кяйвярайнен, 1975], позволяющий разделять эффективное время корреляции  $\tau^{\text{эф}} = \tau_{R+M}$  на составляющие  $\tau_R$  и  $\tau_M$ , используя зависимости результирующей частоты вращения спин-метки от отношения  $T/\eta$ . С учетом закона Стокса – Эйнштейна для вращательной диффузии макромолекулы уравнение (2) запишется как:

$$\tau_{R+M}^{-1} = \tau_R^{-1} + 3kT/4\pi V_M \eta_1,$$

где  $\eta_1$  – вязкость растворителя,  $V_M$  – эффективный объем белка. При постоянной температуре величина  $\tau_R$  определяется эффективной микровязкостью белковой матрицы ( $\eta_2^{\text{эф}}/T$ ), а  $\tau_M$  – вязкостью растворителя ( $\eta_1^{\text{эф}}/T$ ). Если вязкость растворителя изменяется в небольших пределах, то изменением собственного времени корреляции спин-метки можно пренебречь, поскольку микровязкость водно-белковой матрицы на два порядка больше и соответствующее слагаемое вносит практически постоянный вклад в динамику спин-метки независимо от вязкости. В этом случае  $\tau_{R+M}^{-1} \approx \tau_M^{-1}$ , и выражение для наклона зависимости  $\tau_{R+M}^{-1}$  от  $T/\eta_1$  будет иметь вид:

$$\Delta(\tau_{R+M}^{-1})/\Delta(T/\eta_1) = 3k/(4\pi \tau_M^{\text{эф}}). \quad (3)$$

В стандартных условиях ( $(\eta/T)_{\text{ст.}} = 3 \times 10^{-5}$  Пз/К) величина наклона составит  $3 \times 10^{-5}/\tau_M$ . Лишь при значениях вязкости растворителя, сравнимых с эффективной микровязкостью белковой матрицы, можно ожидать отклонения этой зависимости от линейности. Аппроксимация линейного участка зависимости  $\tau_{R+M}^{-1}$  от  $T/\eta$  к бесконечной вязкости в точке пересечения с осью ординат дает:  $\tau_{R+M}^{-1} = \tau_R^{-1}$ . Ранее на основе этих фактов нами был предложен способ расчета значений удельной поверхностной энергии в области локализации спиновой метки [Рошков, Горюнов, 2006].

В то же время наклон экстраполяционных зависимостей будет зависеть от  $V_M$ , величина которого определяется сегментальной подвижностью белка. Последнюю, в свою очередь, отражает ход кривой стабильности белка  $\Delta G_N^D$  от температуры. Чем ближе к экстремуму кривой стабильности (стабильность нативного состояния), тем больше эффективный объем белка  $V_M$  [Royer, Winter, 2011]. По мере уменьшения стабильности нативного состояния (смещения температуры в область как холодной, так и тепловой денатурации) эффективный объем уменьшается (подвижность растет):  $V_M \sim \tau_M^{\text{эф}}$ . Если добавление в раствор белка сахарозы, стабилизирующей структуру белка [Arakawa, Timasheff, 1982; Рожков, 1991], представить как приращение эффективной температуры  $T/\eta$ , то изменение  $\Delta G_N^D$  под влиянием сахарозы может быть рассмотрено как инкремент энергии стабилизации  $|\Delta G_N^D(T+\Delta(T/\eta)) - \Delta G_N^D(T)|/\Delta(T/\eta)$ . Если приращение приходится на максимум кривой энергии стабилизации, то наклон будет мал, а  $V_M$  будет принимать большие значения ( $V_M \sim \tau_M^{\text{эф}}$ ). Метод ЭПР спин-метки позволяет регистрировать эти изменения путем построения вязкостных изотерм  $\tau_M^{\text{эф}}$ .

Изменение расстояний между парамагнитными центрами в застеклованных (77 К) дисперсиях белков определяли по диполь-дипольному уширению линий спектра, используя параметр  $d_1/d$  – отношение суммарной интенсивности крайних компонент спектра к интенсивности центральной компоненты и соответствующей номограмме [Лихтенштейн, 1974].

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены температурные зависимости времени корреляции  $\tau_M^{\text{эф}}$  для САЧ-СМ в фосфатном буферном растворе, содержащем 0,15 М NaCl, а также тяжелую воду и ПЭГ-40.  $\tau_M^{\text{эф}}$  рассчитано по формуле (3) на основе параметров спектров ЭПР, полученных для ТЕМПО-дихлортриазиновой спин-метки, связанной с молекулами САЧ. Для САЧ-СМ в буферном растворе с NaCl характер зависимости немонотонный, с выраженным температурным изменением (переходом)  $\tau_M^{\text{эф}}$  в окрестности 33 °С. В то же время в растворе, содержащем D<sub>2</sub>O, наблюдается два температурных перехода – в окрестности 15 и 33 °С (рис. 1/2).

Структурно-динамическое состояние молекул альбумина характеризуется рядом обра-

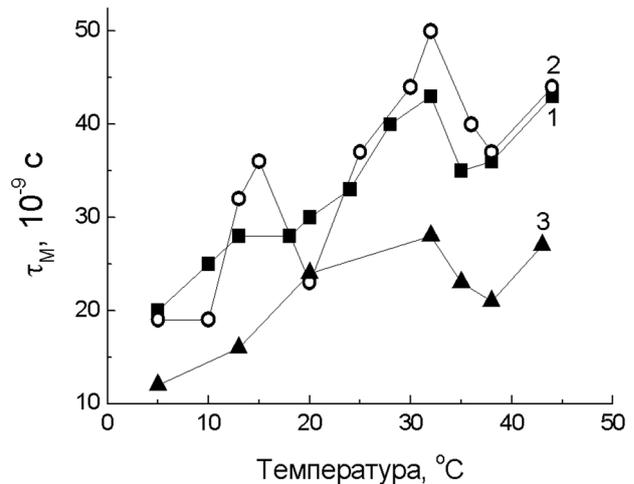


Рис. 1. Температурные изменения эффективного времени вращательной корреляции  $\tau_M^{\text{эф}}$  молекул сывороточного альбумина человека (САЧ), модифицированных спиновой меткой на основе ТЕМПО-дихлортриазина:

1 – в 0,01 М фосфатном буферном растворе pH 7,3, содержащем 0,15 М NaCl; 2 – то же в присутствии 5 % D<sub>2</sub>O; 3 – то же, что 1, в присутствии 2 % ПЭГ-40. Концентрация САЧ 13 мг/мл.  $\tau_M^{\text{эф}}$  пропорционально эффективному объему вращения молекулы САЧ

Fig. 1. Temperature changes of the effective rotational correlation time  $\tau_M^{\text{ef}}$  of human serum albumin (HSA) molecule, modified by TEMPO-dychlortriazine based spin label:

1 – in 0.01 M phosphate buffer solution pH 7.3, containing 0.15 M NaCl; 2 – the same in presence of 5 % D<sub>2</sub>O; 3 – the same as 1 in presence of 2 % PEG-40. HSA concentration 13 mg/mL.  $\tau_M^{\text{ef}}$  is proportional to the effective molecule rotation volume of HSA

тимых конформационных переходов в области нефизиологических значений pH [Fullerton et al., 2006]. Повышение температуры до 55 °С также вызывает постепенное и обратимое изменение конформации белка на уровне вторичной структуры. Наиболее значимые изменения, обусловленные разворачиванием одного из доменов белка, проявляются около 42–43 °С [Rezaei et al., 2006; Iosin et al., 2011]. Для области 58–65 °С характерно резкое начало денатурационных процессов [Borzova et al., 2016]. В то же время холододенатурация происходит в области отрицательных температур, при этом L–L переход с ВКТП в области положительных температур наблюдали в присутствии ПЭГ [Wang, Annunziata, 2006].

Сравнительно недавно было обнаружено [Bian et al., 2014], что в диапазоне температур 12–20 °С сывороточный альбумин в растворе представлен единственным нативным конформером А, в то время как в диапазоне температур 22–50 °С белок представлен двумя нативными конформерами А и В, причем доля кон-

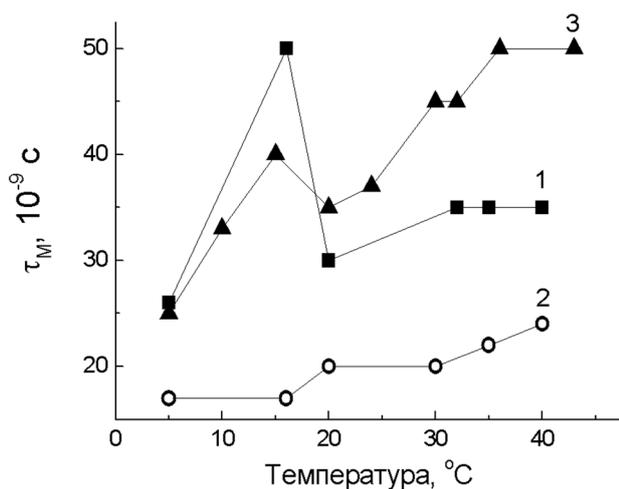


Рис. 2. Температурные изменения эффективного времени вращательной корреляции  $\tau_M^{\text{эф}}$  молекул сывороточного альбумина человека (САЧ), модифицированных меткой на основе ТЕМПО-дихлортриазина, в 0,01 М фосфатном буферном растворе pH 7,3, содержащем:

1 – 0,15 М NaCl и 0,6 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2 – 0,15 М NaCl и 1 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3 – 0,75 М NaCl. Концентрация САЧ – 30 мг/мл

Fig. 2. Temperature changes of the effective rotational correlation time  $\tau_M^{\text{эф}}$  of human serum albumin (HSA) molecule, modified by TEMPO-dichlorotriazine based spin label in 0.01 M phosphate buffer solution pH 7.3, containing:

1 – 0.15 M NaCl and 0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2 – 0.15 M NaCl and 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3 – 0.75 M NaCl. HSA concentration 30 mg/mL

формера В растет с температурой. При 58 °C и выше происходит спонтанное превращение А в В. Эти данные об А и В конформерах позволяют объяснить наличие двух обнаруженных нами максимумов (переходов) в присутствии  $\text{D}_2\text{O}$  (рис. 2). Известно, что стабильность структуры белка под влиянием  $\text{D}_2\text{O}$  возрастает в соответствующих интервалах, что указывает на важную роль гидратации в стабилизации. Кроме того,  $\text{D}_2\text{O}$  способствует стабилизации мономерной формы белка [Reslan, Kauzer, 2016]. Конформеры А и В должны иметь соответствующие кривые стабилизации, что также, вероятно, проявляется в присутствии  $\text{D}_2\text{O}$  [Braun et al., 2017]. Это означает, что обнаруженные переходы обусловлены конформационными превращениями молекул САЧ.

Чтобы рассмотреть взаимосвязь этих превращений со структурным состоянием дисперсии САЧ, была исследована реакция конформеров белка на изменение ионной силы растворителя посредством увеличения концентрации солей, обладающих менее (NaCl) и более  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  выраженной способностью «высаливать» САЧ. Под «высаливанием» подразумевается уменьшение термодинамической

устойчивости дисперсии, содержащей белки в соответствующей конформации.

На рис. 2 показаны температурные зависимости величины  $\tau_M^{\text{эф}}$  при изменении содержания хлорида натрия и сульфата аммония. При концентрациях, которые можно отнести к диапазону средних, общая тенденция, как и по данным рис. 1, заключается в увеличении  $\tau_M^{\text{эф}}$  с ростом температуры. Однако положение перехода смещается в область более низких температур. При повышении концентрации соли растет низкотемпературный максимум, но в области более высоких температур значения  $\tau_M^{\text{эф}}$  уменьшаются, что, вероятно, отражает дестабилизацию структуры белка. В области «высаливающих» концентраций солей значения  $\tau_M^{\text{эф}}$  во всем диапазоне температур значительно уменьшаются (рис. 2/2). Похожая тенденция наблюдается и в присутствии ПЭГ-40 (рис. 1/3). Здесь  $\tau_M^{\text{эф}}$  при 5 °C еще ниже – 12 нс, и наблюдается фазовое разделение (ФП L–L) раствора, проявляющееся как помутнение при достижении соответствующей температуры и критической концентрации белка. Эти особенности поведения  $\tau_M^{\text{эф}}$  отражают ФП L–L с верхней критической температурой, который регистрируется в дисперсии альбумина в таких условиях [Wang, Annunziata, 2006].

Значение  $\tau_M^{\text{эф}}$  при 5 °C, равное 12 нс, фиксировалось ранее в растворах антидинитрофенильных антител (IgG-СМ) со спин-меченым гаптенем динитрофенилом в присутствии полимеров ПЭГ и декстрана [Рожков, 1984]. При этом также наблюдалось помутнение раствора. Иммуноглобулины принадлежат к классу белков с ВКТР [Wang et al., 2014], то есть фазовое разделение L–L в дисперсии этих белков происходит при понижении температуры, а критическая точка сдвигается в сторону более высоких температур с ростом концентрации ПЭГ. Таким образом, низкотемпературный переход с ВКТР наблюдается как для САЧ-СМ, так и для IgG-СМ в присутствии ПЭГ.

Другой ФП L–L в дисперсии альбумина – с нижней критической температурой – наблюдается в присутствии трехвалентных солей в диапазоне 15–20 °C [Matsarskaia et al., 2016]. В этом случае фазовое разделение идет при повышенных температурах, а с ростом концентрации соли температура перехода уменьшается. Вероятно, этот же переход имеет место и в нашем случае при увеличении концентрации  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Такой эффект можно объяснить тем, что в условиях фазового разделения наряду с молекулами в исходном нативном состоянии появляются более лабильные конформеры, которые группируются в кластеры отдельной

фазы при ФП L–L с НКТР. В целом стабильность нативного состояния молекул падает, и эффективный объем молекулы белка  $V_m \sim \tau_m$  определяется самодиффузией отдельных структурных доменов белка, а не макромолекулы в целом. С другой стороны, форма спектров ЭПР спин-метки в условиях помутнения по-прежнему указывает на существенную иммобилизацию подвижности метки, поскольку она в этом случае определяется значением времени корреляции  $\tau_R$ , которое может существенно возрастать в присутствии солей из-за их поверхностно-инактивных свойств. Это приводит к росту поверхностного натяжения и стабилизации собственной динамики метки в области ее локализации [Рожков, Горюнов, 2006].

Для спин-метки ТЕМПО-малеимида, имеющей единственный центр посадки на Цис-34 молекулы САЧ и флуктуирующей между двумя состояниями с разным микроокружением, на основе формулы (1) были рассчитаны эффективные значения разности термодинамических функций – энтальпии  $\Delta H$ , энтропии  $T\Delta S$ , свободной энергии  $\Delta G$  между состояниями. Результаты расчетов для различных молярных концентраций NaCl и CaCl<sub>2</sub> представлены на рис. 3. Значения  $\Delta H$ ,  $T\Delta S$  и  $\Delta G$  перехода отражают состояния водно-белковой матрицы. Обращает на себя внимание резкое изменение энтальпии и энтропии состояния метки в области концентраций NaCl ~ 0,3 М при концентрации белка 200 мг/мл. Однако ранее было показано, что скачок термодинамических функций происходит при тем меньшей концентрации NaCl, чем меньше концентрация белка, т. е. выполняется условие  $m_2/m_3 = \text{const}$  [Rozhkov, 2004], где  $m_2$  и  $m_3$  – молярные концентрации белка и соли соответственно. Это означает, что переход обусловлен не только общими молярными концентрациями белка и соли, но и их соотношением, что подтверждается данными других авторов [Braun et al., 2017; Matsarskaia et al., 2018]. В работе [Rozhkov, Goryunov, 2010] теоретически показано, что такое соотношение концентраций компонент характеризует положение линий спинодали и бинодали, которыми описывают ФП L–L, на ФД системы вода-белок-соль.

Как следует из рис. 3, в присутствии CaCl<sub>2</sub> также наблюдается «скачок» термодинамических функций, но он является менее резким и происходит при существенно меньших концентрациях ионов. При дальнейшем увеличении концентрации CaCl<sub>2</sub>, превышающей 1 М, значения  $\Delta S$  и  $\Delta H$  уменьшаются, т. е. наблюдается как бы обратный переход. Аналогичная зависимость получена ранее и для MgCl<sub>2</sub> [Рожков, 1997]. При этом в диапазоне концентраций

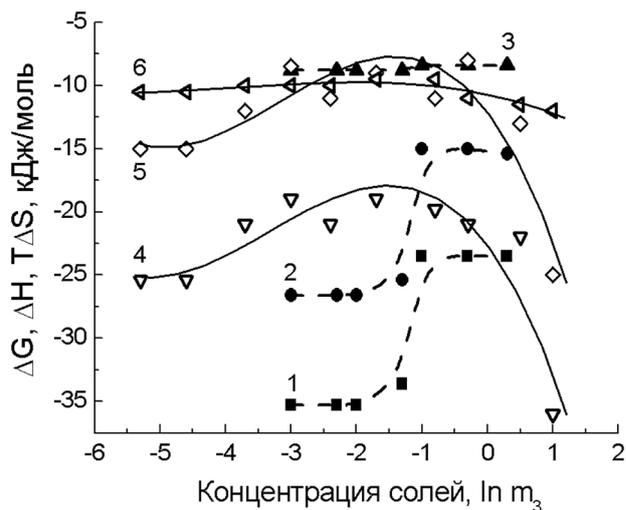


Рис. 3. Эффективные значения термодинамических функций состояния водно-белковой матрицы – энтальпии  $\Delta H$ , энтропии  $T\Delta S$ , свободной энергии  $\Delta G$ , приведенных к 15°C, для растворов молекул сывороточного альбумина человека (САЧ), модифицированных меткой на основе ТЕМПО-малеимида, при разных молярных концентрациях солей  $m_3$ :

1, 2, 3 – NaCl; 4, 5, 6 – CaCl<sub>2</sub>; 1, 4 –  $\Delta H$ ; 2, 5 –  $T\Delta S$ ; 3, 6 –  $\Delta G$ . Концентрация САЧ – 110 мг/мл

Fig. 3. Effective values of the thermodynamic state functions of the water-protein matrix – enthalpy  $\Delta H$ , entropy  $T\Delta S$ , free energy  $\Delta G$  reduced to 15°C, for the solutions of human serum albumin (HSA) molecules, modified by TEMPO-maleimide based spin label, at different molar salt concentrations  $m_3$ :

1, 2, 3 – NaCl; 4, 5, 6 – CaCl<sub>2</sub>; 1, 4 –  $\Delta H$ ; 2, 5 –  $T\Delta S$ ; 3, 6 –  $\Delta G$ . HSA concentration 110 mg/mL

1–2 М наблюдался фазовый переход раствора, проявляющийся как помутнение при достижении критической концентрации белка и соли (ФП L–L), тогда как дальнейшее повышение концентрации соли (> 2 М) приводило к тому, что раствор вновь становился прозрачным. Именно таким образом проявляются так называемые *реентрантные* (возвратные) фазовые переходы, также относящиеся к категории ФП L–L [Zhang et al., 2010] и обнаруживаемые в дисперсиях альбумина. Соли трехвалентных металлов вызывают как прямой, так и возвратный фазовый переход уже при малых концентрациях благодаря высоким значениям ионной силы, что связано с повышенным зарядом катионов и их способностью к сорбции в центрах специфического связывания на белке. При этом зависимость коэффициента активности соли от ее ионной силы для них является убывающей при низких концентрациях и возрастающей при повышении концентрации соли [Герасимов, 1973]. Это согласуется с изменением растворимости белка и его взаимодействия с ионами

электролита. Аналогичный механизм проявляется и в присутствии двухвалентных ионов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{MgCl}_2$  [Рожков, 1997], но при их большей концентрации по сравнению с трехвалентными. В этом случае увеличение активности при повышении ионной силы сопровождается повышенной сорбцией как трехвалентных катионов, так и  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Mg}^{+2}$  на поверхности белка и образованием нового электростатического потенциала отталкивания, но уже другого знака по сравнению с исходным.

На рис. 4 представлены температурные зависимости параметра  $d_1/d$ , рассчитанного из характеристик спектра ЭПР спин-метки ТЕМПО-малеимид, связанной с САЧ, для разных концентраций NaCl в дисперсии белка. Эти зависимости  $d_1/d$  отражают изменение среднего расстояния взаимодействия между спин-метками ( $l$ ) в дисперсии ( $d_1/d \sim l^{-1}$ ). Данные получены на основе измерения диполь-дипольного взаимодействия между спин-метками, зависящего от расстояния между ними, на молекулах белка в условиях полной заморозки (остановки диффузии макромолекул) при 77 К [Лихтенштейн, 1974]. Для этого образцы, предварительно выдержанные при соответствующей температуре, мгновенно погружали в жидкий азот. Предполагается, что каждое фазовое состояние дисперсии в определенном диапазоне температур стабильности фазы характеризуется своим средним распределением диполей спин-меток и соответствующим средним расстоянием между молекулами белка.

Данные рис. 4 указывают, что расстояние между спин-метками увеличивается под влиянием возрастающих концентраций NaCl. Наиболее вероятно, это связано с изменением структурного (фазового) состояния раствора (дисперсии), что согласуется с данными рис. 3, также указывающими на фазовый переход. Используя методику оценки из работы Г. И. Лихтенштейна [1974], мы определили, что среднее расстояние между спин-метками в растворах с высокой концентрацией солей на 1–2 нм больше, чем в низкосолевых. При этом в диапазоне средних концентраций соли фазовая перестройка начинается с высоких температур. Естественно предположить, что сначала меняется структура раствора, связанная со стабильностью А-конформера САЧ в области повышенных температур, поскольку зачастую температура и соли действуют симбатно, разрушая гидратационный барьер стабилизации А-конформера. Вместе с тем известно, что при комнатных температурах доля олигомеров альбумина может составлять до 20 % [Fullerton et al., 2006], и скорее всего, это связано с тем,

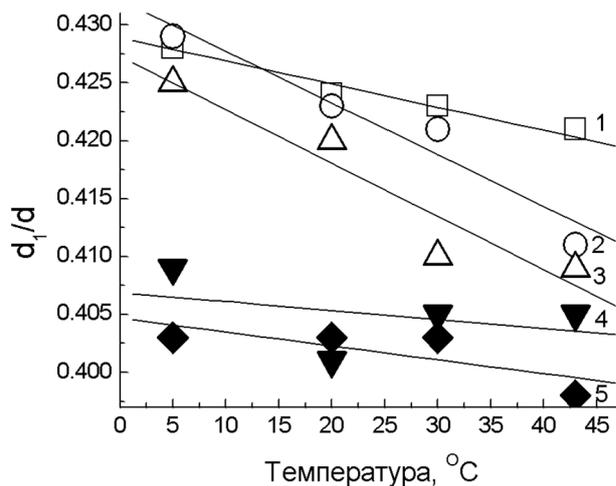


Рис. 4. Температурные зависимости параметра  $d_1/d$  спектра ЭПР для ТЕМПО-малеимидных спин-меток на молекулах сывороточного альбумина человека (САЧ) при разных концентрациях NaCl. Линейная аппроксимация призвана показать, что в целом температурные зависимости являются убывающими.

1 – 0,001 M NaCl; 2 – 0,01 M NaCl; 3 – 0,15 M NaCl; 4 – 0,5 M NaCl; 5 – 1,2 M NaCl. Концентрация САЧ – 50 мг/мл; 0,001 M фосфатный буфер, pH 7,3. Температура регистрации спектра 77 К.  $d_1/d$  пропорционально среднему расстоянию между спин-метками ( $d_1/d \sim l^{-1}$ )

Fig. 4. Temperature dependences of the ESR spectrum parameter  $d_1/d$  for TEMPO-maleimide spin labels at human serum albumin (HSA) molecules at different NaCl concentrations. The linear approximation is intended to show that, in general, the temperature dependences are decreasing.

1 – 0.001 M NaCl; 2 – 0.01 M NaCl; 3 – 0.15 M NaCl; 4 – 0.5 M NaCl; 5 – 1.2 M NaCl. HSA concentration 50 mg/mL; 0.001 M phosphate buffer, pH 7.3. Temperature of the spectrum registration 77 K.  $d_1/d$  is proportional to the average distance between spin labels ( $d_1/d \sim l^{-1}$ )

что белок находится в состоянии А-конформера. Возможно, именно постепенное разрушение олигомеров под действием температуры и солей будет приводить к увеличению среднего расстояния диполь-дипольного взаимодействия. При этом в области умеренных концентраций солей разрушение олигомеров сначала будет способствовать росту концентрации мономеров в А-конформации (рост  $\tau_{M}^{ob}$  в области низких температур на рис. 2), а затем превращению А-конформеров в В-конформеры с их последующим участием в высокотемпературных ФП L–L с НКТР.

Представленные результаты по соль-индуцируемому фазовым переходам в дисперсии САЧ-СМ, наряду с данными литературы, позволяют качественно определить на ФД области, где могут наблюдаться различные состояния белка и его дисперсии, в том числе ассоциаты белка и фазовые переходы между этими со-

стояниями: L-L ФП [Wang, Annunziata, 2006], A и B конформационные состояния [Bian et al., 2014]; олигомеры белка [Fullerton et al., 2006], упорядоченные агрегаты амилоидоподобных фибрилл [Juarez et al., 2009a, b].

На рис. 5 в координатах температура – концентрация белка (при фиксированной концентрации соли) представлена гипотетическая ФД водной дисперсии СА с нижней и верхней критическими температурами L-L переходов и соответствующими линиями бинодалей. Мы считаем, что условные кривые растворимости конформеров A и B хотя и не совпадают с кривыми растворимости белка в целом, но располагаются в непосредственной близости. В области промежуточных температур линии растворимости A и B могут пересекать линии растворимости

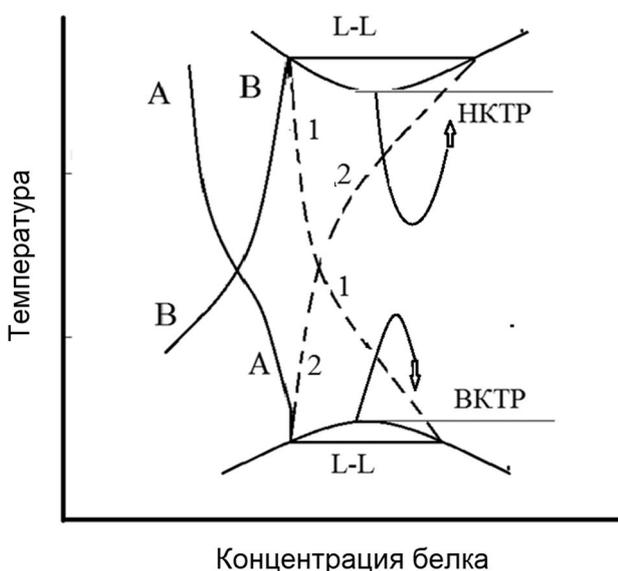


Рис. 5. Гипотетическая фазовая диаграмма водно-солевых растворов сывороточного альбумина в координатах температура – концентрация.

A и B – кривые растворимости конформеров белка. Фазовые переходы жидкость-жидкость в области линий бинодали (горизонтальные отрезки) соответствуют системам с нижней и верхней критическими температурами растворения (НКТП и ВКТП). Пунктирные линии – возможные кривые растворимости для олигомеров белка (1) и криволинейных фибрилл (2) в закритической области между НКТП и ВКТП. Кривые со стрелками показывают возможные изменения температур критических точек при увеличении концентрации солей

Fig. 5. A hypothetical phase diagram of serum albumin water-salt solutions in temperature – concentration coordinates.

A and B are the solubility curves of protein conformers. Liquid-liquid phase transitions in the region of binodal lines (horizontal segments) correspond to the systems with lower and upper critical solution temperatures (LCST and UCST). Dashed lines are the probable solution curves for the protein oligomers (1) and curved fibrils (2) in the overcritical region between LCST and UCST. Arrow curves show possible changes of the critical point temperatures when the salt concentration increases

сти белка, и это отражает тот факт, что при повышении температуры химический потенциал конформера B становится меньше, чем у конформера A, который все больше превращается в B-форму, а при пониженных температурах, напротив, химический потенциал A-конформера становится ниже и он преобладает в растворе белка. Слева от этих линий конформеры образуют истинный раствор, тогда как справа от них находится область состояний, в которой наблюдается образование соответствующих надмолекулярных образований (конденсационных состояний) в растворе белка. Так, в области повышенных температур справа от кривой A могут возникать фибриллы белка путем одноступенчатой конденсации, в то время как на линии бинодали в этой области олигомеры и B-конформеры белка образуют конденсационные структуры в результате ФП L-L, в которых также возможно образование как фибрилл из олигомеров (двухступенчатое фибриллообразование), так и аморфных агрегатов-сферулитов [Adachi et al., 2015]. В результате дестабилизации конденсационных образований, возникающих при ФП L-L в этой области температур, справа от линии бинодали возможно образование метастабильного состояния, представленного криволинейными фибриллами. Такие структуры были обнаружены на примере лизоцима [Miti et al., 2015]. Их растворимость понижается с понижением температуры (кривая 2 на рис. 5), в то время как растворимость олигомеров повышается (кривая 1 на рис. 5) при понижении температуры.

На положение ВКТП и НКТП на температурной шкале существенное влияние могут оказывать изменение концентрации и типов ионов солей и водорастворимых полимеров. В соответствии с распространенными в настоящее время представлениями о симбатном действии роста температуры и солей на состояние гидратации, мы считаем, что с ростом концентрации солей и полимеров разность НКТП и ВКТП может уменьшаться, а при дальнейшем увеличении ионной силы – вновь увеличиваться, создавая условия для реэнтрантных фазовых переходов. Эта возможность отражена на рис. 5 кривыми со стрелками рядом с НКТП и ВКТП. Таким образом, ФД на рис. 5 представляет возможные фазовые состояния дисперсии при изменении ее состава по концентрации как белка, так и осмолитов. При этом с ростом концентрации соли концентрация белка, при которой возможно превращение, уменьшается. При постоянном же составе то или иное конформационное и фазовое изменение может и не наблюдаться в заданном диапазоне температур.

## Заключение

Представлены результаты исследования структурно-динамических свойств сывороточного альбумина человека в водных дисперсиях методом электронного парамагнитного резонанса спиновых меток. В ходе изучения взаимосвязи между фазовыми переходами в дисперсиях САЧ и конформационным состоянием молекул белка получены данные о характеристиках подвижности спин-меток (времени корреляции, термодинамических функциях, константе равновесия), отражающих состояние внутри- и межмолекулярных взаимодействий молекул САЧ. На основании данных о зависимостях этих характеристик от температуры и концентрации NaCl, CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, полиэтиленгликоля и тяжелой воды показано, что переходы на температурных зависимостях времени корреляции  $\tau_M^{\text{эф}}$  спин-метки, находящейся на молекуле САЧ, отражают взаимопревращения низко- и высокотемпературного конформеров белка и их агрегатов. Под влиянием возрастающих концентраций NaCl и сульфата аммония стабилизируется низко-температурный конформер, в том числе и за счет индуцируемого солью разрушения белковых олигомеров. Это проявляется в изменении среднего расстояния между молекулами САЧ в дисперсии. При этом дестабилизация В-конформера ведет к появлению L-L перехода с НКТР. Зависимость константы равновесия структурных состояний белка и рассчитанные на ее основе зависимости свободной энергии, энтальпии и энтропии от концентрации CaCl<sub>2</sub> отражают реэнтрантный фазовый переход типа L-L с НКТР.

На основе полученных результатов на фазовой диаграмме состояний водной дисперсии САЧ определены области термо- и соль-индуцируемых фазовых переходов L-L, а также сопутствующих конформационных состояний и надмолекулярных структур белка – кластеров, олигомеров и других агрегатов.

Показаны возможности и эффективность метода ЭПР спиновых меток для регистрации конформационных изменений, а также для характеристики сопряженных с этими изменениями фазовых свойств дисперсий белка. В дальнейшем данный метод и в целом предложенный подход будет использован для изучения взаимного влияния белков и наночастиц различной природы, для уточнения и обобщения установленных особенностей ФД белка. Конформационные состояния и ассоциаты молекул белка могут быть более детально отображены с помощью ФД в координатах температура – химиче-

ский потенциал компонентов, либо температура – осмотическое давление. Это позволит разработать обобщенную ФД глобулярных белков, учитывающую конформационные, в том числе денатурированные, состояния белка.

*Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0082).*

## Литература

- Бондарев Г. Н., Исаев-Иванов В. В., Исаева-Иванова Л. С., Клейнер А. С., Красоцкая Г. И., Фомичев В. Н., Незлин Р. С., Крымов В. Н., Оранский Л. Г., Бахматский В. Д. Распределение спиновой метки темподихлортриазина по молекуле иммуноглобулина // *Биофизика*. 1988. Т. 33, № 2. С. 212–215.
- Вассерман А. М., Коварский А. Л. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров. М.: Наука, 1986. 246 с.
- Герасимов Я. И., Древинг В. П., Еремин Е. Н., Киселев А. В., Лебедев В. П., Панченков Г. М., Шлыгин А. И. Курс физической химии. Т. 2. М.: Химия, 1973. 614 с.
- Жданов Р. И. Парамагнитные модели биологически активных соединений. М.: Наука, 1981. 280 с.
- Кузнецов А. Н. Метод спиновой зонды (основы и применение). М.: Наука, 1976. 210 с.
- Кяйвярйнен А. И. Раздельное определение собственных времен корреляции спин-меченых белков и связанных с ними меток // *Молекуляр. биология*. 1975. Т. 9, № 6. С. 805–811.
- Ландау М. А. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений. М.: Наука, 1981. 262 с.
- Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974. 256 с.
- Метод спиновых меток. Теория и применение / Ред. Л. Берлинер. М.: Мир, 1979. 639 с.
- Пул Ч. Техника ЭПР-спектроскопии. М.: Мир, 1970. 558 с.
- Рожков С. П. Изучение гибкости некоторых белков крови методом спиновой метки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Купавна, 1984. 23 с.
- Рожков С. П. Стабилизация белка сахарозой по данным метода спиновой метки // *Биофизика*. 1991. Т. 36, № 4. С. 571–576.
- Рожков С. П. Стабилизация альбумина CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> регулируемым взаимодействием макромолекул: исследование методом спиновой метки // *Биофизика*. 1997. Т. 42, № 5. С. 1020–1028.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Определение удельной поверхностной энергии гидратной оболочки белка методом ЭПР с использованием спиновой метки // *Биофизика*. 2006. Т. 51, № 2. С. 236–241. doi: 10.1134/S0006350906020060
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Стабильные, метастабильные и закритическая фазы в растворах глобулярных белков между верхней и нижней темпера-

турами их денатурации // Биофизика. 2017. Т. 62, № 4. С. 665–673. doi: 10.1134/S0006350917040182

Рожков С. П., Горюнов А. С. Фазовые свойства белковых растворов и денатурация белка // Труды КарНЦ РАН. 2019. № 6. С. 5–15. doi: 10.17076/eb1031

Рожков С. П., Кяйвярайнен А. И. Изучение гибкости молекул сывороточного альбумина методом спиновой метки // Биофизика. 1985. Т. 30, № 5. С. 772–776.

Adachi M., So M., Sakurai K., Kardos J., Goto Y. Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation // J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290, no. 29. P. 18134–18145. doi: 10.1074/jbc.M115.648139

Alfano C., Sanfelice D., Martin S. R., Pastore A., Temussi P. A. An optimized strategy to measure protein stability highlights differences between cold and hot unfolded states // Nat. Commun. 2017. Vol. 8. P. 15428. doi: 10.1038/ncomms15428

Arakawa T., Timasheff S. N. Stabilization of protein structure by sugars // Biochemistry. 1982. Vol. 21. P. 6536–6544. doi: 10.1021/bi00268a033

Auer S., Ricchiuto P., Kashchiev D. Two-step nucleation of amyloid fibrils: omnipresent or not? // J. Mol. Biol. 2012. Vol. 422, no. 5. P. 723–730. doi: 10.1016/j.jmb.2012.06.022

Aznauryan M., Nettels D., Holla A., Hofmann H., Schuler B. Single-molecule spectroscopy of cold denaturation and the temperature-induced collapse of unfolded proteins // J. Am. Chem. Soc. 2013. Vol. 135, no. 38. P. 14040–14043. doi: 10.1021/ja407009w

Bian L., Wu D., Hu W. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography // Biomed. Chromatogr. 2014. Vol. 28. P. 295–301. doi: 10.1002/bmc.3020

Borzova V. A., Markossian K. A., Chebotareva N. A., Klymenov S. Y., Stein-Margolina V. A., Markov D. I., Kurganov B. I., Poliansky N. B., Muranov K. O., Shubin V. V. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin // PLoS One. 2016. Vol. 11, no. 4: e0153495. doi: 10.1371/journal.pone.0153495

Braun M. K., Wolf M., Matsarskaia O., Da Vela S., Roosen-Runge F., Sztucki M., Roth R., Zhang F., Schreiber F. Strong isotope effects on effective interactions and phase behavior in protein solutions in the presence of multivalent ions // J. Phys. Chem. B. 2017. Vol. 121, no. 7. P. 1731–1739. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b12814

Buell A. K. The nucleation of protein aggregates – from crystals to amyloid fibrils // Int. Rev. Cell. Mol. Biol. 2017. Vol. 329. P. 187–226. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.08.014

Dignon G. L., Zheng W., Kim Y. C., Mittal J. Temperature-Controlled Liquid-Liquid Phase Separation of Disordered Proteins // ACS Cent. Sci. 2019. Vol. 5(5). P. 821–830. doi: 10.1021/acscentsci.9b00102

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

Fullerton G. D., Kanal K. M., Cameron I. L. Osmotically unresponsive water fraction on proteins: Non-ideal osmotic pressure of bovine serum albumin as a func-

tion of pH and salt concentration // Cell Biol. Int. 2006. Vol. 30, no. 1. P. 86–92. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.11.001

Grigsby J. J., Blanch H. W., Prausnitz J. M. Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions: effect of salt type, salt concentration and pH // Biophys. Chem. 2001. Vol. 91, no. 3. P. 231–243. doi: 10.1016/s0301-4622(01)00173-9

Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of bovine serum albumin adsorbed onto gold nanoparticles // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2011. Vol. 217, no. 2–3. P. 395–401. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.11.012

Juarez J., Goy-Lopez S. G., Cambón A., Taboada P., Mosquera V. Influence of electrostatic interactions on the fibrillation process of human serum albumin // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, no. 30. P. 10521–10529. doi: 10.1021/jp902224d

Juarez J., Taboada P., Goy-Lopez S., Cambón A., Madec M.-B., Yeates S. G., Mosquera V. Additional supra-self assembly of human serum albumin under amyloid-like forming solution conditions // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, no. 36. P. 12391–12399. doi: 10.1021/jp904167e

Li D., Zhang W., Yu X., Wang Z., Su Z., Wei G. When biomolecules meet graphene: from molecule-level interactions to material design and applications // Nanoscale. 2016. Vol. 8, no. 47. P. 19491–19509. doi: 10.1039/C6NR07249F

Ma L., Cui Q. Temperature dependence of salt-protein association is sequence specific // Biochemistry. 2006. Vol. 45, no. 48. P. 14466–14472. doi: 10.1021/bi0613067

Matsarskaia O., Braun M. K., Roosen-Runge F., Wolf M., Zhang F., Roth R., Schreiber F. Cation-induced hydration effects cause lower critical solution temperature behavior in Protein Solutions // J. Phys. Chem. B. 2016. Vol. 120, no. 31. P. 7731–7736. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b04506

Matsarskaia O., Roosen-Runge F., Lotze G., Möller J., Mariani A., Zhang F., Schreiber F. Tuning phase transitions of aqueous protein solutions by multivalent cations // Phys. Chem. Chem. Phys. 2018. Vol. 20, no. 42. P. 27214–27225. doi: 10.1039/c8cp05884a

Miti T., Mulaj M., Schmit 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

Pavičević A., Luo J., Popović-Bijelić A., Mojović M. Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin // Eur. Biophys. J. 2017. Vol. 46, no. 8. P. 773–787. doi: 10.1007/s00249-017-1257-z

Peters T. All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA, Academic Press, Inc., 1996.

Reslan M., Kayser V. The effect of deuterium oxide on the conformational stability and aggregation of bovine serum albumin // Pharm. Dev. Technol. 2016. Vol. 23, no. 10. P. 1030–1036. doi: 10.1080/10837450.2016.1268157

Rezaei T. M., Moghaddamnia S. H., Ranjbar B., Amani M., Marashi S.-A. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures

by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006. Vol. 39, no. 5. P. 530–536. doi: 10.5483/BMBRep.2006.39.5.530

Royer C., Winter R. Protein hydration and volumetric properties // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2011. Vol. 16, no. 6. P. 568–571. doi: 10.1016/j.cocis.2011.04.008

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. Effects of inorganic salts on the structural heterogeneity of serum albumin solutions // *Eur. Biophys. J.* 2000. Vol. 28, no. 8. P. 639–647. doi: 10.1007/s002490050004

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Thermodynamic study of protein phases formation and clustering in model water-protein-salt solutions // *Biophys. Chem.* 2010. Vol. 151, no. 1–2. P. 22–28. doi: 10.1016/j.bpc.2010.04.007

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

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Stable, metastable, and supercritical phases in solutions of globular proteins between upper and lower denaturation temperatures // *Biophysics.* 2017. Vol. 62, no. 4. P. 539–546. doi: 10.1134/S0006350917040182

Sanfelice D., Temussi P. A. Cold denaturation as a tool to measure protein stability // *Biophys. Chem.* 2016. Vol. 208. P. 4–8. doi: 10.1016/j.bpc.2015.05.007

Senske M., Constantinescu-Aruxandei D., Havenith M., Herrmann Ch., Weingärtner H., Ebbinghaus S. The temperature dependence of the Hofmeister series: thermodynamic fingerprints of cosolute – protein interactions // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. Vol. 18, no. 43. P. 29698–29708. doi: 10.1039/c6cp05080h

Shin Y., Brangwynne C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease // *Science.* 2017. Vol. 357, no. 6357. pii: eaaf4382. doi: 10.1126/science.aaf4382

Smeller L. Pressure temperature phase diagrams of biomolecules // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. Vol. 1595, no. 1–2. P. 11–29. doi: 10.1016/s0167-4838(01)00332-6

Treuel L., Brandholt S., Maffre P., Wiegele S., Shang L., Nienhaus G. U. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle cell interactions // *ACS Nano.* 2014. Vol. 8, no. 1. P. 503–513. doi: 10.1021/nn405019v

Uversky V. N., Li J., Fink A. L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-Synuclein // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, no. 47. P. 44284–44296. doi: 10.1074/jbc.M105343200

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

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.* 2006. Vol. 111, no. 5. P. 1222–1230. doi: 10.1021/jp065608u

Wang Y., Latypov R. F., Lomakin A., Meyer J. A., Kerwin B. A., Vunnum S., Benedek G. B. Quantitative evaluation of colloidal stability of antibody solutions using PEG-induced liquid-liquid phase separation // *Mol. Pharmaceutics.* 2014. Vol. 11, no. 5. P. 1391–1402. doi: 10.1021/mp400521b

Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Böhm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. Temperature behaviour of human serum albumin // *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 104. P. 469–478. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04449.x

Zaman M., Ahmad E., Qadeer A., Rabbani G., Khan R. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation // *Int. J. Nanomedicine.* 2014. Vol. 9. P. 899–912. doi: 10.2147/IJN.S54171

Zhang F., Skoda M. W. A., Jacobs R. M. J., Martin R. A., Martin C. M., Schreiber F. Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions // *J. Phys. Chem. B.* 2006. Vol. 111, no. 1. P. 251–259. doi: 10.1021/jp0649955

Zhang F., Weggler S., Ziller M. J., Ianeselli L., Heck B. S., Hildebrandt A., Kohlbacher O., Skoda M. W. A., Jacobs R. M. J., Schreiber F. Universality of protein reentrant condensation in solution induced by multivalent metal ions // *Proteins.* 2010. Vol. 78, no. 16. P. 3450–3457. doi: 10.1002/prot.22852

Поступила в редакцию 29.03.2020

## References

Bondarev G. N., Isaev-Ivanov V. V., Isaeva-Ivanova L. S., Kleiner A. C., Krasotskaya G. I., Fomichev V. N., Nezhlin P. C., Krymov V. N., Oranskii L. G., Bakhmatkii V. D. Raspredelenie spinovoi metki tempodikhlorotriazina po molekule immunoglobulina [Distribution of the tempodichlorotriazine spin label in the immunoglobulin molecule]. *Biofizika* [Biophysics]. 1988. Vol. 33, no. 2. P. 212–215.

Gerasimov Ya. I., Dreving V. P., Eremin E. N., Kiselev A. V., Lebedev V. P., Panchenkov G. M., Shlygin A. I. Kurs fizicheskoi khimii [A course of physical chemistry]. Vol. 2. Moscow: Khimiya, 1973. 614 p.

Kuznetsov A. N. Metod spinovogo zonda (osnovy i primeneniye) [Spin probe method (basics and application)]. Moscow: Nauka, 1976. 209 p.

Käiväräinen A. I. Razdel'noe opredelenie sobstvennykh vremen korrelyatsii spin-mechenykh belkov i svyazannykh s nimi metok [Separate determination of inherent correlation times for spin-labeled proteins and labels coupled to them]. *Molekulyar. biol.* [Molecular Biol.] 1975. Vol. 9, no. 6. P. 805–811.

Landau M. A. Molekulyarnye mekhanizmy deistviya fiziologicheskii aktivnykh soedinenii [Molecular mecha-

nisms of physiologically active compounds action]. Moscow: Nauka, 1981. 262 p.

Likhtenstein G. I. Spin-labeling methods in molecular biology. London: John Wiley and Sons Ltd., 1976. 258 p.

Poole C. P. Electron spin resonance: a comprehensive treatise on experimental techniques. N. Y. e. a.: Interscience Publ., 1967. 810 p.

Rozhkov S. P. Izuchenie gibkosti nekotorykh belkov krovi metodom spinovoi metki [The study of the flexibility of some blood proteins by the spin label method]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Kupavna, 1984. 23 p.

Rozhkov S. P. Stabilization of protein by sucrose as shown by the spin label method. *Biophysics*. 1991. Vol. 36, no. 4. P. 565–570.

Rozhkov S. P. Stabilizatsiya al'bumina CaCl<sub>2</sub> i MgCl<sub>2</sub> reguliruemym vzaimodeistviem makromolekul: issledovanie metodom spinovoi metki [Stabilization of albumin by the CaCl<sub>2</sub>- and MgCl<sub>2</sub>-regulated interaction of macromolecules: A study by the spin-label method]. *Biofizika* [Biophysics]. 1997. Vol. 42, no. 5. P. 1020–1028.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Measurement of specific surface energy of the protein hydration shell using spin label EPR. *Biophysics*. 2006. Vol. 51, no. 2. P. 196–201. doi: 10.1134/S0006350906020060

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Stable, metastable, and supercritical phases in solutions of globular proteins between upper and lower denaturation temperatures. *Biophysics*. 2017. Vol. 62, no. 4. P. 539–546. doi: 10.1134/S0006350917040182

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Fazovye svoystva belkovykh rastvorov i denaturatsiya belka [Phase properties of protein solutions and protein denaturation]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. No. 6. 2019. P. 5–15. doi: 10.17076/eb1031

Rozhkov S. P., Käiväräinen A. I. Study of the flexibility of serum albumin molecules by the spin label method. *Biophysics*. 1985. Vol. 30, no. 5. P. 838–844.

Wasserman A. M., Kovarskii A. L. Spinovye metki i zondy v fiziko-khimii polimerov [Spin labels and zones in the physical chemistry of polymers]. Moscow: Nauka, 1986. 246 p.

Zhdanov R. I. Paramagnitnye modeli biologicheskii aktivnykh soedinenii [Paramagnetic models of biologically active compounds]. Moscow: Nauka, 1981. 280 p.

Adachi M., So M., Sakurai K., Kardos J., Goto Y. Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation. *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290, no. 29. P. 18134–18145. doi: 10.1074/jbc.M115.648139

Alfano C., Sanfelice D., Martin S. R., Pastore A., Temussi P. A. An optimized strategy to measure protein stability highlights differences between cold and hot unfolded states. *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. P. 15428. doi: 10.1038/ncomms15428

Arakawa T., Timasheff S. N. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*. 1982. Vol. 21. P. 6536–6544. doi: 10.1021/bi00268a033

Auer S., Ricchiuto P., Kashchiev D. Two-step nucleation of amyloid fibrils: omnipresent or not? *J. Mol. Biol.* 2012. Vol. 422, no. 5. P. 723–730. doi: 10.1016/j.jmb.2012.06.022

Aznauryan M., Nettels D., Holla A., Hofmann H., Schuler B. Single-molecule spectroscopy of cold de-

naturation and the temperature-induced collapse of unfolded proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135, no. 38. P. 14040–14043. doi: 10.1021/ja407009w

Berliner L. J. (ed.) Spin labeling. Theory and applications. New York: Academic Press, 1976. 592 p.

Bian L., Wu D., Hu W. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2014. Vol. 28. P. 295–301. doi: 10.1002/bmc.3020

Borzova V. A., Markossian K. A., Chebotareva N. A., Klyemenov S. Y., Stein-Margolina V. A., Markov D. I., Kurganov B. I., Poliansky N. B., Muranov K. O., Shubin V. V. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. *PLoS One*. 2016. Vol. 11, no. 4: e0153495. doi: 10.1371/journal.pone.0153495

Braun M. K., Wolf M., Matsarskaia O., DaXVela S., Roosen-Runge F., Sztucki M., Roth R., Zhang F., Schreiber F. Strong isotope effects on effective interactions and phase behavior in protein solutions in the presence of multivalent ions. *J. Phys. Chem. B*. 2017. Vol. 121, no. 7. P. 1731–1739. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b12814

Buell A. K. The nucleation of protein aggregates – from crystals to amyloid fibrils. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2017. Vol. 329. P. 187–226. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.08.014

Dignon G. L., Zheng W., Kim Y. C., Mittal J. Temperature-Controlled Liquid–Liquid Phase Separation of Disordered Proteins. *ACS Cent. Sci.* 2019. Vol. 5(5). P. 821–830. doi: 10.1021/acscentsci.9b00102

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

Fullerton G. D., Kanal K. M., Cameron I. L. Osmotically unresponsive water fraction on proteins: Non-ideal osmotic pressure of bovine serum albumin as a function of pH and salt concentration. *Cell Biol. Int.* 2006. Vol. 30, no. 1. P. 86–92. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.11.001

Grigsby J. J., Blanch H. W., Prausnitz J. M. Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions: effect of salt type, salt concentration and pH. *Biophys. Chem.* 2001. Vol. 91, no. 3. P. 231–243. doi: 10.1016/s0301-4622(01)00173-9

Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of bovine serum albumin adsorbed onto gold nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2011. Vol. 217, no. 2–3. P. 395–401. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.11.012

Juarez J., Goy-Lopez S. G., Cambón A., Taboada P., Mosquera V. Influence of electrostatic interactions on the fibrillation process of human serum albumin. *J. Phys. Chem. B*. 2009. Vol. 113, no. 30. P. 10521–10529. doi: 10.1021/jp902224d

Juarez J., Taboada P., Goy-Lopez S., Cambón A., Madec M.-B., Yeates S. G., Mosquera V. Additional supra-self assembly of human serum albumin under amyloid-like forming solution conditions. *J. Phys. Chem. B*. 2009. Vol. 113, no. 36. P. 12391–12399. doi: 10.1021/jp904167e

- Li D., Zhang W., Yu X., Wang Z., Su Z., Wei G. When biomolecules meet graphene: from molecule-level interactions to material design and applications. *Nanoscale*. 2016. Vol. 8, no. 47. P. 19491–19509. doi: 10.1039/C6NR07249F
- Ma L., Cui Q. Temperature dependence of salt-protein association is sequence specific. *Biochemistry*. 2006. Vol. 45, no. 48. P. 14466–14472. doi: 10.1021/bi0613067
- Matsarskaia O., Braun M. K., Roosen-Runge F., Wolf M., Zhang F., Roth R., Schreiber F. Cation-induced hydration effects cause lower critical solution temperature behavior in protein solutions. *J. Phys. Chem. B*. 2016. Vol. 120, no. 31. P. 7731–7736. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b04506
- Matsarskaia O., Roosen-Runge F., Lotze G., Möller J., Mariani A., Zhang F., Schreiber F. Tuning phase transitions of aqueous protein solutions by multivalent cations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. Vol. 20, no. 42. P. 27214–27225. doi: 10.1039/c8cp05884a
- Miti T., Mulaj M., Schmit 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
- Pavićević A., Luo J., Popović-Bijelić A., Mojović M. Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin. *Eur. Biophys. J.* 2017. Vol. 46, no. 8. P. 773–787. doi: 10.1007/s00249-017-1257-z
- Peters T. All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA, Academic Press, Inc., 1996.
- Reslan M., Kayser V. The effect of deuterium oxide on the conformational stability and aggregation of bovine serum albumin. *Pharm. Dev. Technol.* 2016. Vol. 23, no. 10. P. 1030–1036. doi: 10.1080/10837450.2016.1268157
- Rezaei T. M., Moghaddamnia S. H., Ranjbar B., Amani M., Marashi S.-A. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006. Vol. 39, no. 5. P. 530–536. doi: 10.5483/BMBRep.2006.39.5.530
- Royer C., Winter R. Protein hydration and volumetric properties. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2011. Vol. 16, no. 6. P. 568–571. doi: 10.1016/j.cocis.2011.04.008
- 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. Effects of inorganic salts on the structural heterogeneity of serum albumin solutions. *Eur. Biophys. J.* 2000. Vol. 28, no. 8. P. 639–647. doi: 10.1007/s002490050004
- Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Thermodynamic study of protein phases formation and clustering in model water-protein-salt solutions. *Biophys. Chem.* 2010. Vol. 151, no. 1–2. P. 22–28. doi: 10.1016/j.bpc.2010.04.007
- Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions. *J. Supercrit. Fluid.* 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028
- Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Stable, metastable, and supercritical phases in solutions of globular proteins between upper and lower denaturation temperatures. *Biophysics*. 2017. Vol. 62, no. 4. P. 539–546. doi: 10.1134/S0006350917040182
- Sanfelice D., Temussi P. A. Cold denaturation as a tool to measure protein stability. *Biophys. Chem.* 2016. Vol. 208. P. 4–8. doi: 10.1016/j.bpc.2015.05.007
- Senske M., Constantinescu-Aruxandei D., Havenith M., Herrmann Ch., Weingärtner H., Ebbinghaus S. The temperature dependence of the Hofmeister series: thermodynamic fingerprints of cosolute – protein interactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. Vol. 18, no. 43. P. 29698–29708. doi: 10.1039/c6cp05080h
- Shin Y., Brangwynne C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. 2017. Vol. 357, no. 6357. pii: eaaf4382. doi: 10.1126/science.aaf4382
- Smeller L. Pressure temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. Vol. 1595, no. 1–2. P. 11–29. doi: 10.1016/s0167-4838(01)00332-6
- Treuel L., Brandholt S., Maffre P., Wiegele S., Shang L., Nienhaus G. U. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle cell interactions. *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, no. 1. P. 503–513. doi: 10.1021/nn405019v
- Uversky V. N., Li J., Fink A. L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-Synuclein. *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, no. 47. P. 44284–44296. doi: 10.1074/jbc.M105343200
- 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
- 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*. 2006. Vol. 111, no. 5. P. 1222–1230. doi: 10.1021/jp065608u
- Wang Y., Latypov R. F., Lomakin A., Meyer J. A., Kerwin B. A., Vunnum S., Benedek G. B. Quantitative evaluation of colloidal stability of antibody solutions using PEG-induced liquid-liquid phase separation. *Mol. Pharmaceutics*. 2014. Vol. 11, no. 5. P. 1391–1402. doi: 10.1021/mp400521b
- Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Böhm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. Temperature behaviour of human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 104. P. 469–478. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04449.x
- Zaman M., Ahmad E., Qadeer A., Rabbani G., Khan R. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *Int. J. Nanomedicine*. 2014. Vol. 9. P. 899–912. doi: 10.2147/IJN.S54171
- Zhang F., Skoda M. W. A., Jacobs R. M. J., Martin R. A., Martin C. M., Schreiber F. Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 111, no. 1. P. 251–259. doi: 10.1021/jp0649955

Zhang F., Weggler S., Ziller M. J., Ianeselli L., Heck B. S., Hildebrandt A., Kohlbacher O., Skoda M. W. A., Jacobs R. M. J., Schreiber F. Universality of protein reentrant condensation in solution induced by

multivalent metal ions. *Proteins*. 2010. Vol. 78, no. 16. P. 3450–3457. doi: 10.1002/prot.22852

Received March 29, 2020

## 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

### **Крупнова Марина Юрьевна**

старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: mukrupnova@rambler.ru  
тел.: (8142) 769810

## CONTRIBUTORS:

### **Rozhkov, Sergey**

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

### **Goryunov, Andrey**

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

### **Krupnova, Marina**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: mukrupnova@rambler.ru  
tel.: (8142) 769810