

УДК 577.3

## ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЕ СРОДСТВО К РАСТВОРИТЕЛЮ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ КРИТИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУР РАСТВОРЕНИЯ БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ

**С. П. Рожков, А. С. Горюнов**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

В связи с сопряженностью внутри- и межмолекулярных взаимодействий в белковых системах фазовые превращения белковых растворов, интерес к которым обусловлен их значением для биотехнологии и биомедицины, должны быть проанализированы с точки зрения их взаимосвязи с фазовыми превращениями структуры белковых молекул, в частности на основе данных о термодинамических функциях. Температурные тренды стандартных термодинамических функций нативного (N) и денатурированного (D) белка в растворе рассмотрены в рамках представлений об избыточных функциях смешения, характеризующих термодинамическое сродство молекул белка к растворителю. Построены термодинамические функции смешения белков в N и D состояниях на основе микрокалориметрических данных. Показано, что характер изменения с температурой энтальпии, энтропии и свободной энергии белка свидетельствует о теоретически возможном наличии в его растворе как верхней, так и нижней критических температур растворения (смешения). Для некоторых белков в специальных условиях (состав растворителя, pH и др.) на это ранее имелись только экспериментальные указания, но не было дано термодинамической интерпретации. При этом в области фазовой диаграммы между нижней и верхней критическими температурами растворения имеется закритическая зона. Она носит двухфазный или однофазный характер в зависимости от конформации белка – D или N соответственно. Это относится к диапазону температур, сопредельному с физиологическим, и открывает возможность для описания надмолекулярной организации белкового раствора в этих условиях. Значение зоны закритических фазовых состояний белковых растворов определяется ее возможной ролью в саморегуляции системы в ответ на изменение внешних условий среды (температуры, солёности, кислотности и др.).

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** фазовая диаграмма; закритические состояния; термодинамические функции смешения; критические температуры растворения; конформационные состояния.

### **S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. THERMODYNAMIC AFFINITY FOR SOLVENT AS A CRITERION OF CRITICAL SOLUTION TEMPERATURES OF PROTEIN MACROMOLECULES**

Phase transitions of protein solutions which are of interest for biotechnological and biomedical purposes should be analyzed from the point of view of their interrelation with phase transitions of the structure of protein molecules on the basis of the state thermodynamic functions. This is suggested by the coupling of intra- and intermolecular interactions in protein systems. Temperature trends of the standard thermodynamic functions of

native (N) and denatured (D) protein in a solution have been considered within the framework of the concept of excessive melting functions, which determine the thermodynamic affinity of protein molecules for solvent. Thermodynamic solution functions of protein in the native (N) and denatured (D) states were built on the basis of microcalorimetry data. The nature of temperature-related changes in enthalpy, entropy and free energy suggests a theoretical possibility of both higher and lower critical solution temperatures being present. Previously there were only experimental indications for some proteins under certain conditions (solvent composition, pH, etc.), but thermodynamic interpretation was lacking. Furthermore, there appears a supercritical zone between the low and the high critical solution temperatures in the phase diagram. This zone is of two-phase or one-phase type depending on the protein conformation – D or N, respectively. This applies to the range next to physiological temperatures and makes the description of supramolecular organization of a protein solution possible under such conditions. The significance of the supercritical zone of protein phase states is determined by its probable contribution to self-regulation of the system in response to changes in environmental conditions (temperature, salinity, acidity, etc.).

**Keywords:** phase diagram; supercritical states; thermodynamic melting functions; critical solution temperatures; conformational states.

Система внутримолекулярных взаимодействий (связей), определяющих конформацию белка в растворе, простирается за пределы собственно макромолекулы белка независимо от количества составляющих ее полипептидных цепей вплоть до надмолекулярного уровня организации, включая и образование кристаллов [Ламри, Билтонен, 1973; Финкельштейн, Птицын, 2002]. Это позволяет сопоставлять фазовые превращения самих белковых структур с фазовыми превращениями в растворах белка. В настоящее время исследование соотношения конформации белков с возникающей в белковых системах структурной организацией в предденатурационной области температур привлекает все большее внимание [Golub et al., 2007; Vemporad, Chiti, 2012; Nicolai, Durand, 2013; Miti et al., 2015] в связи с возрастающим интересом к проблемам кристаллизации белков, возникновения сложной гетерофазной организации растворов белков в широком диапазоне температур и составов, расшифровки физико-химических механизмов конденсационных заболеваний. Однако до сих пор как экспериментально, так и теоретически анализируются дисперсии белков с ВКТР (верхней критической температурой растворения (смешения) метастабильных жидких фаз, различающихся по концентрации белка). В то же время белковые дисперсии, исследованные на предмет построения фазовых диаграмм (ФД), в равной степени представлены системами как с ВКТР, так и с **нижней критической температурой растворения (НКТР)** [Muschol, Rozenberger, 1997; Grouazel et al., 2006]. Кроме того, в растворах белков (альбумина, лизоцима, инсулина), имеющих ВКТР в низкотемпературном диапазоне, в высокотемпературном диапазоне и/или при пониженных

значениях pH имеет место активное фазовое разделение, характерное для систем с НКТР [Juarez et al., 2009; Ravi et al., 2014]. Растворы различных гемоглобинов, в зависимости от лигандного состояния, степени насыщения кислородом, взаимодействия с фосфатами, могут изменять агрегатное (фазовое) состояние как при понижении, так и при повышении температуры [Рожков, 1996; Han, Herzfeld, 1998]. Поэтому есть основания полагать, что растворы молекул белка одного и того же типа в зависимости от состава растворителя, pH и/или других условий могут менять свое фазовое состояние как при нагревании, так и при охлаждении и иметь как НКТР, так и ВКТР. Теоретический термодинамический анализ таких систем показывает, что объяснение наличия одновременного НКТР и ВКТР требует тщательного учета свойства воды как растворителя [Рожков, 1996; Shiryaev et al., 2005], а именно термодинамического сродства белка к растворителю.

В работе ставится задача рассмотреть температурные тренды стандартных термодинамических функций нативного (N) и денатурированного (D) белка в растворе в рамках представлений об избыточных функциях смешения, используя известные данные о термодинамических функциях состояния молекул глобулярных белков, а на этой основе установить, теоретически исходя из представлений физической химии растворов биополимеров, возможность того, что ФД раствора макромолекул глобулярного белка содержит одновременно как НКТР, так и ВКТР. Это открывает путь для построения в дальнейшем обобщенной фазовой диаграммы водных растворов глобулярных белков путем совмещения двух типов ФД – с нормальной и ретроградной растворимостью белка.

Типичные экспериментальные зависимости разности энтальпии  $\Delta H_N^D = H^D - H^N$ , энтропии  $\Delta S_N^D = S^D - S^N$  и энергии Гиббса  $\Delta G_N^D = G^D - G^N$  денатурированного и нативного белка свидетельствуют о том, что тепловая и холодовая денатурация глобулярных белков – это ФП, близкие к ФП 1 рода, которые происходят при  $\Delta G_N^D = 0$  [Привалов, 1987]. Максимум на кривой  $\Delta G_N^D$  в промежутке между точками тепловой и холодовой денатурации характеризует максимальную стабилизацию нативной структуры белка в области температур, близких к физиологическим. Однако, в силу опосредованного растворителем сопряжения внутри- и межмолекулярных взаимодействий белковых молекул, аналогичные переходы должны присутствовать и на ФД белковых растворов. Это обусловлено и тем, что именно взаимодействие с водой определяет тепловые эффекты макромолекул и топологическую модель структуры раствора, где в конфигурациях случайных плотных упаковок молекул белка существуют элементы как кристаллографических, так и некристаллографических (кластеры, фибриллы) упаковок.

Поскольку вода является идеальным растворителем для неполярных органических жидкостей при температурах выше 112 °С, в том числе и для неполярных групп белка, считается, что в этих условиях они не должны взаимодействовать с водой [Привалов, 1987], т. е. компоненты раствора как бы не смешаны и находятся в своих основных состояниях. Микрокалориметрические данные о термодинамических функциях белков в нативном и денатурированном состояниях [Пфайль, Привалов, 1982; Привалов, 1987] могут быть использованы для построения термодинамических функций смешения, характеризующих термодинамическое сродство белка к растворителю:

$$\Delta H_M^N = H^N - H^C; \Delta S_M^N = S^N - S^C; \Delta G_M^N = G^N - G^C$$

и

$$\Delta H_M^D = H^D - H^C; \Delta S_M^D = S^D - S^C; \Delta G_M^D = G^D - G^C,$$

где  $H^C, S^C, G^C$  – термодинамические функции компонентов раствора в основных состояниях; индекс М обозначает функцию смешения. Тогда избыток изменения термодинамической функции раствора для нативного белка (энтальпии и энтропии) может быть записан как

$$\Delta H_E^N = \Delta H_M^N - \Delta H_M^D = H^N - H^D;$$

$$\Delta S_E^N = \Delta S_M^N - \Delta S_M^D = S^N - S^D,$$

и для раствора денатурированного белка:

$$\Delta H_E^D = \Delta H_M^D - \Delta H_M^N = H^D - H^N$$

и

$$\Delta S_E^D = \Delta S_M^D - \Delta S_M^N = S^D - S^N.$$

Индекс Е обозначает избыточное изменение функции.

Поскольку температура фазового перехода Т определяется из условия  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = 0$ , то фазовый переход в растворе нативного белка будет иметь место при температуре:

$$T = \Delta H_E^N / \Delta S_E^N \sim (H^N - H^D) / (S^N - S^D), \quad (1)$$

и в растворе денатурированного белка при температуре:

$$T = \Delta H_E^D / \Delta S_E^D \sim (H^D - H^N) / (S^D - S^N). \quad (2)$$

С другой стороны, способы экспериментального определения и расчета термодинамических функций нативного и денатурированного состояний белка в растворе, так же как и содержание этих понятий, позволяют считать, что приводимые значения [Пфайль, Привалов, 1982] близки по смыслу и величине термодинамическим функциям растворения (смешения) для этих состояний [Гросберг, Хохлов, 1989; Тагер, 2007]. Это позволяет судить о характере изменений термодинамических функций, и в частности  $\Delta G_M$  растворения нативного и денатурированного белка по зависимостям, известным для  $G_D$  и  $G_N$  [Привалов, 1987]: кривые располагаются полностью (N) или преимущественно (D) в отрицательной области значений с максимумом при близких к нулю положительных температурах. Исходя из положений физической химии растворов полимеров, если  $\Delta G_M$  в области более низких температур возрастает по абсолютной величине, а в области более высоких температур убывает с ростом температуры, то на фазовой диаграмме раствора полимера имеем как ВКТР, так и НКТР, причем ВКТР < НКТР. Сама фазовая диаграмма при этом представляет собой две кривые с экстремумами: верхняя – с минимумом в НКТР, нижняя – с максимумом в ВКТР. Именно такой характер изменений мы и наблюдаем как для  $G_N$ , так и для  $G_D$ : свободная энергия как нативного, так и денатурированного состояний снижается в диапазоне выше 20 °С; в диапазоне ниже 10 °С наблюдается лишь небольшое снижение свободной энергии, хотя сам ход зависимостей не оставляет сомнений в том, что свободная энергия обоих состояний в этом и более низкотемпературном диапазоне уменьшается по абсолютной величине с ростом температуры.

Это, конечно же, ни в коем случае не означает, что область НКТР и соответствующего фазового разделения отвечает холодовой денатурации белка, а область ВКТР – тепловой денатурации.

Энтальпия и энтропия нативного состояния белка при достаточно низких температурах

превышают энтальпию и энтропию денатурированного состояния [Пфайль, Привалов, 1982; Привалов, 1987]. Экспериментальные температурные зависимости функций стандартной энтропии и энтальпии денатурированного и нативного белка свидетельствуют, что по мере роста температуры эти функции меняют знак, причем энтальпия переходит через ноль при более низкой температуре.

Из уравнения (1) следует, что температуры фазового перехода определены при условии: (1)  $\Delta H_E^N > 0$ ;  $\Delta S_E^N > 0$  и (2)  $\Delta H_E^N < 0$ ;  $\Delta S_E^N < 0$ . Анализ показывает, что условие (1) выполняется при температурах ниже точки пересечения функций  $H^D$  и  $H^N$ , т. е. при низких температурах, а условие (2) выполняется при температурах выше точки пересечения  $S^D$  и  $S^N$  – при высоких температурах. Поскольку характер изменения избыточных энтальпии и энтропии с температурой указывает на тип критической температуры растворения [Тагер, 2007], то в рассматриваемом случае ВКТР должна иметь место при низких температурах, а НКТР – при высоких, а между ВКТР и НКТР, в области физиологических температур, однофазная область.

Из уравнения (2) следует, что температуры фазового перехода определены при условии: (1)  $\Delta H_E^D > 0$ ;  $\Delta S_E^D > 0$  и (2)  $\Delta H_E^D < 0$ ;  $\Delta S_E^D < 0$ . Анализ показывает, что ВКТР в этом случае будет при высоких температурах, а НКТР при низких, т. е. двухфазная область должна быть замкнутой и захватывать область физиологических температур.

Таким образом, фазовые диаграммы могут содержать НКТР и ВКТР для растворов как нативного, так и денатурированного белка, однако их взаиморасположение различается для двух состояний белка. Область ФД между НКТР и ВКТР является открытой закритической зоной в случае раствора нативного белка и замкнутой закритической зоной для раствора денатурированного белка в диапазоне температур, сопредельном физиологическому. Биологическое значение этой зоны определяется тем, что именно в этой области ФД, которая сопряжена с зоной критических фазовых переходов, система вода–белок–соль в наибольшей степени способна к саморегуляции в ответ на изменения температуры и/или солёности среды, что могло бы служить моделью установления механизмов взаимодействия протеиноидной системы клетки с окружающей средой в реализации основополагающих принципов гомеостаза.

*Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ 0221-2014-0010).*

## Литература

Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р. Статистическая физика макромолекул. М.: Наука, 1989. 344 с.

Ламри Р., Билтонен Р. Термодинамические и кинетические аспекты конформации белков в связи с физиологическими функциями // Структура и стабильность биологических макромолекул / Ред. Н. Тимашев, Г. Д. Фасман. Пер. с англ. М.: Мир, 1973. 584 с.

Привалов П. Л. Стабильность белка и гидрофобные взаимодействия // Биофизика. 1987. Т. 32, № 5. С. 742–759.

Пфайль В., Привалов П. Конформационные изменения в белках // Биохимическая термодинамика / Ред. М. Джоунс. Пер. с англ. М.: Мир, 1982. 440 с.

Рожков С. П. Критические явления в водно-солевых растворах биополимеров // Журн. физ. химии. 1996. Т. 70, № 11. С. 1982–1986.

Тагер А. А. Физико-химия полимеров. М.: Научный мир, 2007. 576 с.

Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. М.: Университет, 2002. 376 с.

Vemporad F., Chiti F. Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationship // Chemistry and Biology. 2012. Vol. 19. P. 315–327. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.02.003.

Golub N., Meremyanin A., Markossian K. et al. Evidence for the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation // FEBS Letters. 2007. Vol. 581. P. 4223–4227. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.066.

Grouazel S., Bonnet F., Astier J.-P. et al. Exploring bovine pancreatic trypsin inhibitor phase transitions // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110. P. 19664–19670. doi: 10.1021/jp0627123.

Han J., Herzfeld J. Interpretation of the osmotic behavior of sickle cell hemoglobin solutions: different interactions among monomers and polymers // Biopolymers. 1998. Vol. 45. P. 299–306. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(19980405)45:4<299::AID-BIP4>3.0.CO;2-G.

Juarez J., Taboada P., Goy-Lopez S. et al. Additional supra-self-assembly of human serum albumin under amyloid-like-forming solution conditions // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113. P. 12391–12399. doi: 10.1021/jp904167e.

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases // Biomacromolecules. 2015. Vol. 16. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r.

Muschol M., Rozenberger F. Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization // J. Chem. Phys. 1997. Vol. 107, No 6. P. 1953–1962. doi: 10.1063/1.474547.

Nicolai T., Durand D. Controlled food protein aggregation for new functionality // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2013. Vol. 18. 249–256 p. doi: 10.1016/j.cocis.2013.03.001.

Ravi V. K., Swain T., Chandra N., Swaminathan R. On the characterization of intermediates in the isodemic aggregation pathway of hen lysozyme at alkaline pH



// PLOS One. 2014. Vol. 9, No 1. 87256 p. doi: 10.1371/journal.pone.0087256.

Shiryayev A., Pagan D. L., Gunton J. D. et al. Role of solvent for globular proteins in solution

// J. Chem. Phys. 2005. Vol. 122. 234911 p. doi: 10.1063/1.1931655.

Поступила в редакцию 04.09.2015

## References

Finkel'stein A. V., Ptitsyn O. B. Fizika belka [Protein physics]. Moscow: Mir, 2002. 376 p.

Grosberg A. Y., Khokhlov A. R. Statisticheskaja fizika makromolekul [Statistical physics of macromolecules]. Moscow: Nauka, 1989. 344 p.

Lamri R., Biltonen R. Termodinamicheskie i kineticheskie aspekty konformatsii belkov v svyazi s fiziologicheskimi funktsiyami [Thermodynamic and kinetic aspects of protein conformation in physiological functions]. In: Structure and stability of biological macromolecules. Eds. N. Timasheff, G. D. Fasman. N. Y.: Marcel Dekker, 1969. 584 p.

Privalov P. L. Stabil'nost' belka i gidrofobnye vzaimodejstviya [Protein stability and hydrophobic interactions]. Biofizika. 1987. Vol. 32, No 5. P. 742–759.

Pfeil V., Privalov P. Konformacionnye izmeneniya v belkah [Conformational changes in proteins]. In: Biochemical Thermodynamics. Ed. M. N. Jones. Amsterdam, Oxford, N. Y.: Elsevier Scientific Publ. Co., 1979. 440 p.

Rozhkov S. P. Kriticheskie javleniya v vodno-solevyh rastvorah biopolimerov [Critical phenomena in water-salt biopolymer solutions]. Zhurn. fiz. himii. 1996. Vol. 70, No 11. P. 1982–1986.

Tager A. A. Fiziko-himija polimerov [Physical Chemistry of Polymers]. Moscow: Nauchnyi Mir, 2007. 576 p.

Bemporad F., Chiti F. Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationship. Chemistry and Biology. 2012. Vol. 19. P. 315–327. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.02.003.

Golub N., Meremyanin A., Markossian K., Eronina T., Chebotareva N., Asryants R., Mironets V., Kurganov B. Evidence for the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation. FEBS Letters. 2007. Vol. 581. P. 4223–4227. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.066.

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. P. 19664–19670. doi: 10.1021/jp0627123.

Han J., Herzfeld J. Interpretation of the osmotic behavior of sickle cell hemoglobin solutions: different interactions among monomers and polymers. Biopolymers. 1998. Vol. 45. P. 299–306. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(19980405)45:4<299::AID-BIP4>3.0.CO;2-G.

Juarez J., Taboada P., Goy-Lopez S., Cambon 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. P. 12391–12399. doi: 10.1021/jp904167e.

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. Biomacromolecules. 2015. Vol. 16. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r.

Muschol M., Rozenberger F. Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization. J. Chem. Phys. 1997. Vol. 107, No 6. P. 1953–1962. doi: 10.1063/1.474547.

Nicolai T., Durand D. Controlled food protein aggregation for new functionality. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2013. Vol. 18. P. 249–256. doi: 10.1016/j.cocis.2013.03.001.

Ravi V. K., Swain T., Chandra N., Swaminathan R. On the characterization of intermediates in the isodemic aggregation pathway of hen lysozyme at alkaline pH. PLOS One. 2014. Vol. 9, No 1. 87256 p. doi: 10.1371/journal.pone.0087256.

Shiryayev A., Pagan D. L., Gunton J. D., Rhen D. S., Saxena A., Lookman T. Role of solvent for globular proteins in solution. J. Chem. Phys. 2005. Vol. 122. 234911 p. doi: 10.1063/1.1931655.

Received September 4, 2015

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра 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 Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru

## 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