

УДК 577.3

ФАЗОВЫЕ ДИАГРАММЫ БЕЛКОВОГО РАСТВОРА И СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ БЕЛКА

С. П. Рожков, А. С. Горюнов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Анализ стандартных термодинамических функций белка позволяет установить важные особенности фазового поведения белковых растворов, в частности, наличие на фазовой диаграмме (ФД) нижней и верхней критических температур растворения. Сопоставление фазовых и соответствующих конформационных превращений белковых структур с фазовыми превращениями раствора белка в целом на основе ФД дает возможность рассмотреть вопрос о соотношении конформации белков со структурной организацией белковых систем в предденатурационной области. В координатах температура–энтропия представлена ФД раствора глобулярного белка, на основе которой анализируются фазовые состояния раствора и устанавливается вероятная связь топологических структур, возникающих в закритической области ФД, с фазовыми процессами в низко- и высокотемпературной области, что демонстрирует возможность совмещения двух типов ФД – с нормальной и ретроградной растворимостью белка. В координатах температура – плотность упаковки предложена обобщенная ФД белкового раствора с нижней и верхней критическими температурами смешения и закритической зоной между ними, характерной для раствора нативного (N) белка, а также замкнутой зоной для раствора денатурированного (D) белка в диапазоне температур, сопредельном физиологическому. На этой основе с учетом вклада растворителя в низко- и высокотемпературном интервалах описана надмолекулярная организация белкового раствора, которая включает метастабильные фазы из молекул белка в конформациях, модифицированных по отношению к нативному и денатурированному состояниям, а также динамические кластеры и олигомеры белка в закритической зоне. Различные области ФД интерпретируются, в частности, в предположении, что молекулы в конформациях, соответствующих N и D состояниям, способны формировать различные нанокристаллические суперрешетки, которые определяют топологические особенности структурированности их растворов в широком диапазоне температур. Обсуждается возможная роль закритических фазовых состояний белковых растворов в саморегуляции химических потенциалов компонентов за счет надмолекулярной самоорганизации раствора при изменениях температуры и/или концентрации солей и тем самым в реакции на внешние факторы среды.

Ключевые слова: глобулярный белок; конформационные состояния; фазовые переходы; закритические явления; критические температуры растворения; кластеры белка; надмолекулярная организация.

S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. PROTEIN SOLUTION PHASE DIAGRAMS AND PROTEIN MOLECULE STRUCTURAL TRANSITIONS

An analysis of standard thermodynamic functions of protein structure in solution allows revealing important features of protein solution phase behavior, particularly the presence of

higher and lower critical solution temperatures on phase diagram (PD). Linking the phase and the corresponding conformational transitions of protein molecules to phase transitions of the protein solution as a whole will provide consideration of the relationship between protein conformation and the structural organization of protein systems in the pre-denaturation interval. A phase diagram (PD) for the globular protein solution is presented in the temperature-entropy coordinate plane. Solution phase states have been analyzed and a probable interrelation of topological structures arising in the supercritical region with the phase processes in low- and high-temperature range has been defined when considering PD. This shows the possibility to superpose two types of PD: for normal and retrograde protein solubility. PD in the temperature-packing density plane has been presented for a protein solution with low and high critical solution temperatures and a supercritical zone between them typical of native protein solution, and a closed zone typical of denatured protein solution in the near physiological temperature interval. Supramolecular organization of protein solution has been described on this basis including metastable phases of protein molecules in conformations altered with respect to native (N) and denatured (D) states as well as dynamical protein clusters and oligomers in the supercritical zone. The contribution of the solvent in the low- and high-temperature ranges has also been taken into account. Various PD regions have been interpreted under the assumption that molecules in conformations, corresponding to N and D states are capable of forming different nanocrystal lattices which define the topological features of the corresponding solutions in a wide temperature range. Probable significance of supercritical phase states of protein solutions for the self-regulation of the components' chemical potentials at the expense of the solution supramolecular organization at changing temperature and/or salt concentration and thereby at changing environmental factors has been discussed.

Keywords: globular protein; conformational states; phase transitions; supercritical phenomena; critical solution temperatures; protein clusters; supramolecular organization.

Введение

Фазовые превращения растворов нативных белков, образование конденсированных фаз в биологических жидкостях, содержащих белки, представляют значительный интерес с точки зрения целого ряда областей науки и технологии и лежат в основе разнообразных патологических состояний организма человека. Так, кристаллизация и полимеризация гемоглобина вызывают серповидноклеточную патологию [Charache et al., 1967; Vekilov, 2012]. Образование насыщенной белком жидкой фазы (фазовый переход жидкость – жидкость (L-L)) в сетчатке глаза связано с патологическим процессом, приводящим к катаракте [Berland et al., 1992; Asherie et al., 2001]. Образование кристаллов инсулина в поджелудочной железе защищает инсулин от действия протеаз, присутствующих в островках Лангерганса [Dodson, Steiner, 1998]. Регулируемая скорость растворения белковых кристаллов и обогащенных белком жидких микрокапель обеспечивает пролонгирование действия инсулина, интерферона, гормона роста в фармации; разработка средств доставки лекарственных препаратов основывается на синтезе частиц путем желирования или сшивания обогащенных белком жидких микрокапель [Bromberg et al., 2005].

Фазовые состояния белкового раствора, а также фазовые границы, определяющие условия существования и сосуществования этих состояний, находятся в центре внимания при термодинамическом описании фазовых превращений белковых растворов. Для растворов глобулярных белков были предложены классические варианты диаграмм фазового равновесия, известные для флюидных систем типа газ–жидкость и гетерогенных коллоидных систем [Muschol, Rozenberger, 1997; Zaccarelli, 2007] с фазовым переходом первого рода (ФП 1), заканчивающихся критическим ФП при определенной температуре и составе. В таком виде ФД позволяют представить фазовые равновесия и ФП жидкость – твердое тело (L-S), жидкость – плотная жидкость (L-L), золь – гель, обозначить зону существования метастабильных мезоскопических кластеров белка и олигомеров [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012; Rozhkov, Goryunov, 2010] в закритической области ФД. Ранее нами было обосновано предположение [Рожков, Горюнов, 2014], что именно в области ФД, сопряженной с областью критических фазовых переходов, система вода–белок–соль в наибольшей степени способна к саморегуляции в ответ на изменения температуры и/или солености среды, что могло бы служить моделью установления механизмов

взаимодействия протеиноидной системы клетки с окружающей средой в реализации основополагающих принципов гомеостаза.

До недавнего времени считалось, что при ФП нативных белков с надлежащим образом свернутой полипептидной цепью структура белка не модифицируется, а внутримолекулярная динамика не влияет на термодинамическое равновесие или кинетические характеристики [Vekilov, 2012]. Однако в последнее время обнаруживается, что конформационные свойства белка могут быть весьма существенны с точки зрения механизма образования обогащенных белком микрофаз и мезоскопических кластеров [Vekilov, Vorontsova, 2014; Vorontsova et al., 2015]. В настоящее время исследование соотношения конформации белков с возникающей структурной организацией белковых систем в предденатурационной области температур вызывает все больший интерес [Bemporad, Chiti, 2012; Nicolai, Durand, 2013; Miti et al., 2015]. Поскольку тепловая и холодовая денатурация глобулярных белков представляют собой процессы, близкие к ФП 1 [Привалов, 1987], одним из подходов к рассмотрению этих вопросов является сопоставление фазовых и соответствующих конформационных превращений самих белковых структур с фазовыми превращениями раствора белка на основе обобщенной фазовой диаграммы. Нами ранее показано, что микрокалориметрические данные о стандартных термодинамических функциях белков позволяют установить важные особенности фазового поведения белковых растворов, в частности, одновременное наличие на фазовой диаграмме белкового раствора как нижней, так и верхней критических температур растворения [Рожков, Горюнов, 2015]. Эти результаты свидетельствуют о прямой взаимосвязи между конформационным состоянием белковой макромолекулы и фазовым состоянием белкового раствора, что открывает путь для построения обобщенной фазовой диаграммы водных растворов глобулярных белков, учитывающей и фазовое состояние внутримолекулярной структуры белка.

Таким образом, задача работы заключается в том, чтобы на основании известных термодинамических данных о конформационном состоянии молекул глобулярных белков (на примере лизоцима [Пфайль, Привалов, 1982; Привалов, 1987]) предложить фазовые диаграммы, позволяющие качественно описать фазовые состояния и превращения белковых растворов в широком диапазоне температур, включая низкие и высокотемпературные области, в которых конформационное состояние молекул белка,

а также межмолекулярное взаимодействие, гидратация и топология возникающих надмолекулярных структур существенно изменяются.

Фазовые состояния белкового раствора и фазовая диаграмма в плоскости температура – энтропия

Качественно представим раствор молекул белка в нативном (N) и денатурированном (D) состояниях в рамках топологической модели совокупности плотных упаковок жестких и мягких сфер, различающихся правилами упаковки и потенциалом взаимодействия. Рассмотрим фазовые переходы между N и D состояниями белка, а также раствора белка при этих переходах на фазовой диаграмме в координатной плоскости температура–энтропия (TS), имеющей тесную аналогию с плоскостью давление–объем (PV), где должен отчетливо проявляться скачок энтропии. Вид этих кривых может быть представлен только качественно, ибо даже для газа Ван-дер-Ваальса функции состояния получить не удастся. На рисунке 1 на основании экспериментальных данных о поведении энтропии лизоцима [Пфайль, Привалов, 1982] представлена обобщенная ФД раствора белка в плоскости (TS) в виде семейства изобар, где ФП 1 белка $D \leftrightarrow N$ и соответствующим переходам в растворе сопутствуют скачки энтропии (горизонтальные участки). Поскольку часто предельным случаем ФП 1 в плоскости PV является критический переход, который сопряжен с существованием метастабильных фаз (в нашем случае двух жидких фаз, поэтому это переходы типа L-L), **изобары могут быть представлены не плоским участком, а петлями типа петли Ван-дер-Ваальса (В-д-В), характеризующей переходы газ – жидкость, в том числе иметь изобары критического и за критического типа (см. рис. 1, пунктир).** Каждой изобаре соответствует свое давление (осмотическое), которое зависит от концентрации белка и других компонентов, присутствующих в растворе.

Наличие семейства изобар с петлей В-д-В может быть обусловлено возможностью образования различных метастабильных топологических структур раствора, который выступает как совокупность плотных упаковок жестких и мягких сфер. При этом каждому выделенному конформационному состоянию молекулы белка должен соответствовать свой удельный объем, свой тип гидратации и тип микрокристаллической решетки (или некристаллографических упорядоченных нанокластеров). Так, на примере дисперсий наночастиц показано, что взаимодействие с растворителем может

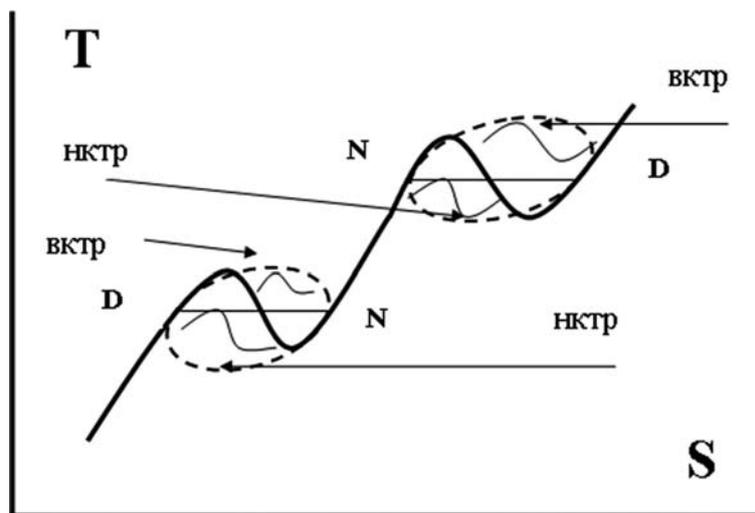


Рис. 1. Схематическое представление фазовой диаграммы раствора глобулярного белка в координатах температура T – стандартная энтропия S с изобарами в форме двух «петель» Ван-дер-Ваальса, соответствующих низкотемпературному и высокотемпературному фазовому переходу.

Горизонтальные отрезки соответствуют ФП первого рода между конформациями, соответствующими нативному и денатурированному состояниям белка. Наличие «петель» в области ФД, ограниченной пунктирными окружностями, указывает на существование метастабильных состояний (микрофаз) раствора белка с измененными конформациями, отличными от денатурированного и нативного. НКТР и ВКТР – нижняя и верхняя критические температуры растворения

способствовать образованию различающихся по плотности упаковки нанокристаллических суперрешеток [Goodfellow, Korgel, 2011] и таким образом приводить к кристаллическому полиморфизму [Wang et al., 2013], влияющему на фазовые свойства раствора.

Наличие критических изобар на рисунке 1 и метастабильных состояний имеет прямое отношение к термодинамической устойчивости системы [Rozhkov, Goryunov, 2014]. Граница термодинамической устойчивости раствора белка по отношению к процессам диффузии (к росту флуктуаций концентрации, предшествующих фазовому разделению) может быть определена из условия $\det|\delta^2G| = 0$, в котором детерминант устойчивости состоит из равных нулю коэффициентов устойчивости. В качестве последних фигурируют производные от термодинамических сил (температура T , давление P , химический потенциал μ_i) по сопряженным с ними координатам (энтропия S , объем V , концентрация c_i соответственно) [Базаров, 1983]. То есть в данном случае экстремумы изобар $\partial T/\partial S = 0$ определяют спинодаль ФД, а ноды, соединяющие противоположные стороны петли В-д-В – бинодаль ФД, аналогичные спинодали и бинодали на общей ФД белковых растворов в координатах температура–концентрация [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012]. Разница заключается в том, что концентрация белка является термодинамическим параметром, пропорциональным осмотическому давлению,

от которого зависит конформация и плотность упаковки белковых молекул в соответствующей «нанокристаллической суперрешетке».

Ранее нами теоретически показана возможность того, что раствор глобулярного белка имеет одновременно как верхнюю, так и нижнюю критические температуры растворения (смешения) (ВКТР и НКТР), причем область между НКТР и ВКТР содержит закритическую зону, которая имеет двухфазный или однофазный характер в зависимости от конформации белка – **D или N соответственно** [Рожков, Горюнов, 2015].

Поскольку для **D-состояния** белка область между критическими точками на рисунке 1 двухфазна, то на закритической изобаре (пунктир) может иметь место петля В-д-В, отражающая тот факт, что метастабильные состояния белка в конформации, промежуточной между **D и N, могут реализоваться в форме мезоскопических белковых кластеров**. То, что она является закритической и отражает непрерывный $D \leftrightarrow D^*$ температурный фазовый переход между различными топологическими структурами раствора, различающимися параметром порядка, может указывать на жидкокристаллическую природу белковых кластеров. Такая же закритическая изобара может иметь место и для непрерывного $N \leftrightarrow N^*$ фазового перехода.

Таким образом, рисунок 1 показывает возможную связь топологических структур, возникающих в закритической области ФД,

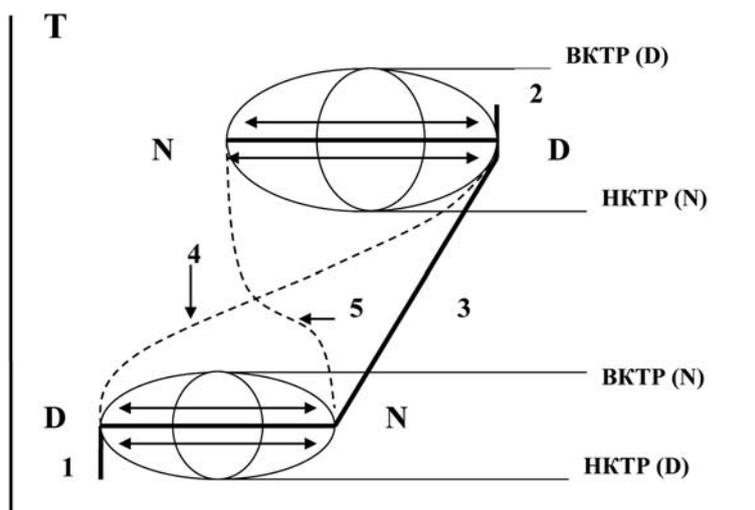


Рис. 2. Фазовая диаграмма раствора глобулярного белка в координатах температура – плотность упаковки.

Вертикальные отрезки 1 и 2 соответствуют фазе раствора с молекулами белка в денатурированном состоянии. Отрезок 3 характеризует твердую фазу белка из нативных молекул. Большие полусегменты представляют бинадали, сопряженные с фазовым переходом (ФП) первого рода между D и N состояниями при низких и высоких температурах (жирные горизонтальные линии). Тонкие стрелки указывают на ФП типа жидкость – жидкость (L-L). Малые полусегменты представляют спинодали, сходящиеся с бинадалями в критических точках: ВКТР и НКТР соответственно для растворов N и D белка. Пунктир 4 – кривая растворимости молекул белка в конформации, близкой к D; 5 – кривая растворимости молекул белка в конформации, близкой к N. Относительное расположение нижнего и верхнего эллипсов весьма условно, так как неизвестна плотность упаковки соответствующих белковых структур в нанокристаллические суперрешетки

с фазовыми процессами в низко- и высоко-температурной области и демонстрирует возможность совмещения двух типов фазовых диаграмм – с нормальной и ретроградной растворимостью белка – в координатной плоскости TS. Следовательно, для лучшего понимания механизмов возникновения структурной организации растворов белка ФД может быть представлена и в других координатах, например, в координатах температура – плотность упаковки, при постоянном давлении, определяемом концентрацией белка. Плотность упаковки здесь может определяться как конформационным состоянием молекул белка, так и строением возможных топологических структур (кристаллографических решеток или некристаллографических структур).

Надмолекулярная организация белкового раствора и фазовая диаграмма в плоскости температура – плотность упаковки

Здесь будем исходить из следующих допущений. Во-первых, считаем, что в D-состоянии при низких температурах молекулы белков образуют кристаллогидраты (clathrate hydrates, solid solvates), гидратация же N-состояния имеет другой тип. Во-вторых, белок может кристаллизоваться в различных кристаллографических сингониях (для лизоцима это тетрагональная и орторомбическая). В этих сингониях

вероятно образование сложных элементарных ячеек, отличающихся по плотности упаковки молекул: объемцентрированная, гранецентрированная, базоцентрированная, а также их деформированные аналоги. В-третьих, нанокристаллическая структура влияет на свойства раствора.

Суммируя вышесказанное, мы предлагаем гипотетическую ФД раствора белка в координатах температура – плотность упаковки для заданной (достаточно большой по отношению к растворимости) концентрации белка как параметра. На рисунке 2 она представлена в широком диапазоне температур, со спинодалями (малые дуги), бинадалями (большие дуги), критическими точками ВКТР и НКТР, замкнутой областью между ВКТР и НКТР для нативного белка (замкнутой областью между НКТР и ВКТР для денатурированного белка), а также кривыми растворимости в закритической области, соответствующими: (4) – молекулам белка с конформациями, близкими к D, способными формировать свой тип кристаллической ячейки и (5) – молекулам белка с конформациями, близкими к N, способными формировать другой тип кристаллической ячейки. Относительное расположение нижних и верхних дуг весьма условно, так как данные об изменении плотности упаковки микрокристаллических ячеек с температурой в литературе отсутствуют.

На рисунке 2 вертикальные отрезки 1 и 2 – это условные границы твердой фазы, образованной денатурированными гидратированными молекулами белка в результате их холодной (1) и тепловой (2) денатурации. Вероятно, в первом случае это кристаллогидраты, возникающие вследствие расклинивающего действия упорядоченной воды из-за взаимодействия с неполярными группами белка. Во втором случае денатурированный белок может образовывать фибриллы, благодаря чему плотность упаковки белка может быть высокой. Отрезок 3 характеризует кристаллическую фазу, сформированную молекулами белка в N-конформации.

Нижний горизонтальный отрезок соответствует равновесию фаз из **D и N молекул, в каждой из которых формируется соответствующая упаковка молекул, различающаяся по плотности.** При этом какая-то часть молекул при температуре выше температуры ФП 1 может оставаться в измененной, промежуточной между **D и N конформации** $\langle(DN)\rangle$ **в результате взаимодействия с растворителем, ионами солей, лигандами и т. п., в которой они способны образовывать нанокристаллическую суперрешетку из дефектных ячеек.** Дальнейшее поведение таких молекул с ростом температуры и концентрации характеризуется кривой растворимости (4). При определенной концентрации и температуре (по мере достижения бинодали) они образуют более плотную метастабильную фазу из $\langle(DN)\rangle$ молекул. **В этой плотной фазе в результате межмолекулярного взаимодействия конформация молекул и гидратация будет более близка к N [King et al., 2014], и в ней могут возникать зародыши твердой N-фазы.** По мере дальнейшего роста температуры в закритической зоне в области кривой растворимости (4) часть $\langle(DN)\rangle$ молекул может переходить в состав достаточно больших метастабильных мезоскопических кластеров (в соответствующих условиях они обнаружены экспериментально [Vekilov, 2012]), поскольку для D-белка эта область двухфазная. Это повышает коллоидную растворимость молекул белка. Наиболее вероятно, что природа таких кластеров – жидкокристаллическая, и обусловлена она остаточной гидратацией, существующей при пониженных температурах и дестабилизирующейся с ростом температуры или под действием электролита. Возможно, что в условиях краудинга (в мезоскопических кластерах) образуются кристаллосольватные структуры благодаря коллективной гидратации биомакромолекул, распространяющейся на расстоянии в несколько нанометров [King et al., 2014]. Можно также допустить, что исходная низкотемпературная

кристаллогидратная структура способна сохраняться при более высоких температурах в составе мезоскопических кластеров. В этих кластерах также могут появляться зародыши твердой фазы, которые, однако, имеют преимущественно иной тип кристаллической сингонии, по сравнению с теми, что создают N-молекулы. Вместе с тем в таких кластерах могут идти и процессы полимеризации вплоть до образования криволинейных фибрилл [Vekilov, 2012]. Таким образом, имеет место непрерывный закритический $D \leftrightarrow D^*$ фазовый переход с изменением параметра порядка.

Кривая (5) характеризует растворимость молекул в N-конформации или близкой к ней. Эти молекулы остаются после разрушения плотных мезоскопических фаз при температурах выше бинодали и критической температуры. Хотя белок в плотной фазе может сохранять признаки кристаллогидратов, его растворимость должна быстро уменьшаться с ростом температуры, поскольку он не способен образовывать метастабильные кластеры, так как для N-конформации закритическая область однофазна. Уменьшение же растворимости с ростом температуры указывает на образование димеров, тримеров и других небольших N-олигомеров [Stradner et al., 2006]. При определенной концентрации белка (граница верхней бинодали ниже $N \leftrightarrow D$ равновесия) N-олигомеры и искривленные фибриллы образуют метастабильные фазы, регистрируемые как L-L фазовый переход [Miti et al., 2015].

Оставшиеся в растворе N^* -мономеры, изменившие свою конформацию в результате непрерывного фазового перехода, при котором меняется параметр порядка, по достижении определенной температуры (рис. 2, верхняя горизонтальная линия) претерпевают ФП 1 с образованием плотных линейных фибрилл [Miti et al., 2015]. **Наличие спинодалей на ФД также подразумевает протекание в этих областях ФД неравновесных, обусловленных кинетикой, процессов гелеобразования и/или преципитации [Miti et al., 2015].**

Заключение

В настоящей работе на основе фазовой диаграммы дана термодинамическая интерпретация особенностей надмолекулярной организации раствора, включающих метастабильные жидкие фазы, кластеры белка, топологии надмолекулярных структур. ФД характеризуется тем, что содержит одновременно НКТР и ВКТР, а также закритическую зону, в которой фазовое состояние раствора белка

определяется его конформационным состоянием. Несмотря на большое значение, которое придается структурно-конформационным изменениям биомакромолекул при повышенных температурах и/или под действием денатурантов в связи с процессами фибриллогенеза, закритическая зона представляет особый интерес. Это область ФД между ВКТР и НКТР, где мономеры белка имеют преимущественно N-конформацию, а в составе мезоскопических кластеров могут быть ближе к D-конформации и формировать жидкокристаллические структуры. Это термодинамически устойчивая и макроскопически однофазная область, хотя термодинамическая устойчивость такой системы, например, по отношению к низко- и высокотемпературным фазам понижена, что проявляется в образовании мезоскопических динамических кластеров белковых молекул и олигомеров в растворе стабильных нативных молекул [Рожков, 2005]. Процессы, происходящие в этой зоне, могут служить моделью физико-химического состояния белковой части клеточной протоплазмы, которую следует рассматривать в сопряжении с состоянием межклеточной жидкости, в силу их совместных возможностей в регуляции гомеостаза в ответ на изменение температуры или состава системы.

Температурный диапазон критической и закритической области системы вода–белок–соль определяется величиной отношения концентрации биополимера к концентрации электролита, которая в рамках используемой модели зависит от числа мест сорбции ионов на белке, заряда белка, коэффициента активности электролита [Рожков, 2005; Rozhkov, Goryunov, 2010]. Закритическое состояние обладает локальным минимумом свободной энергии, поэтому система самопроизвольно достигает этого состояния при изменении состава, например, при увеличении концентрации белка. Система как бы фиксируется в этом состоянии, поскольку при кратковременных скачках внешних параметров среды (температуры, давления, солёности) выход из него оказывается затруднен благодаря низким значениям кинетических коэффициентов, характерных для систем с пониженной устойчивостью. Кроме того, если длительное, но умеренное изменение температуры в ту или иную сторону выводит систему из закритического состояния, то возросшая диффузия компонентов раствора в соседнюю фазу может вызывать уже в ней возникновение критического состояния. Поскольку в критическом состоянии прекращается самодиффузия молекул, это не приводит к потере вещества в соседней фазе в окружении исходной системы из-за диффузии. Поэтому если

воздействие на такую сопряженную систему исчезает, то со временем содержимое исходной системы восстанавливается за счет соседней фазы и состояние исходной системы самопроизвольно возвращается в закритическое. При накоплении в исходной среде количества электролита и биополимеров, удовлетворяющего необходимому соотношению концентраций для образования закритического состояния, оно могло быть объектом запоминания, эволюции и отбора [Рожков, 2005]. В процессе отбора в закритическом состоянии могла оказаться «клеточная цитоплазма», а «межклеточная» жидкость – переходить в критическое состояние при изменении внешних условий, вызывающих перераспределение вещества между «клеткой» и средой [Рожков, Горюнов, 2014]. Такая самосопряженная система теоретически может эффективно реагировать на скачки температуры, солёности и другие дестабилизирующие факторы, поддерживая необходимую гомеостатическую норму функции на единицу структуры, даже без затраты метаболической энергии. Появление же источников такой энергии и мест ее приложения – уже другой этап эволюции и, вероятно, мог быть обусловлен образованием мембраны на границе раздела фаз предкритической и закритической.

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

Литература

- Базаров И. П. Термодинамика. М.: Высшая школа, 1983. 344 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, фазовые равновесия и структурно-температурный оптимум гомеостаза в модельной системе вода–биополимер–электролит // Биофизика. 2005. Т. 50, № 2. С. 215–222.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Фазовые состояния системы вода–белок (полипептид)–соль и реакция на внешние факторы среды // Биофизика. 2014. Т. 59, № 1. С. 54–60.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Термодинамическое сродство к растворителю как критерий критических температур растворения белковых макромолекул // Труды КарНЦ РАН. 2015. № 12. С. 96–100. doi: 10.17076/eb234.
- Asherie N., Pande J., Pande A. et al. Enhanced crystallization of the Cys18 to Ser mutant of bovine gammaB

crystallin // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 314. P. 663–669. doi: 10.1006/jmbi.2001.5155.

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.

Berland C. R., Thurston G. M., Kondo M. et al. Solid-liquid phase boundaries of lens protein solutions // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 1214–1218.

Bromberg L., Rashba-Step J., Scott T. Insulin particle formation in supersaturated aqueous solutions of poly (ethylene glycol) // *Biophys. J.* 2005. Vol. 89. P. 3424–3433. doi: 10.1529/biophysj.105.062802.

Charache S., Conley C. L., Waugh D. F. et al. Pathogenesis of hemolytic anemia in homozygous hemoglobin C disease // *J. Clin. Invest.* 1967. Vol. 46. P. 1795–1811.

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. P. 570–583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152.

Dodson G., Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. Vol. 8. P. 189–194. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80037-7.

Goodfellow B. W., Korgel B. A. Reversible solvent vapor-mediated phase changes in nanocrystal superlattices // *ACS Nano.* 2011. Vol. 5, No 4. P. 2419–2424. doi: 10.1021/nn201273c.

King J. T., Arthur E. J., Brooks III C. L., Kubarych K. J. Crowding induced collective hydration of biological macromolecules over extended distances // *J. Amer. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136. P. 188–194. doi: 10.1021/ja407858c.

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.

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. Supercritical Fluids.* 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028.

Stradner A., Cardinaux F., Schurtenberger P. A small-angle scattering study on equilibrium clusters in lysozyme solutions // *J. Phys. Chem. B.* 2006. Vol. 110. P. 21222–21231. doi: 10.1021/jp0639804.

Vekilov P. G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions // *J. Phys.: Condens. Matter.* 2012. Vol. 24. P. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101.

Vekilov P. G., Vorontsova M. A. Nucleation precursors in protein crystallization // *Acta Cryst.* 2014. Vol. F70. P. 271–282. doi: 10.1107/S2053230X14002386.

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

Wang Z., Schliehe C., Bian K. et al. Correlating superlattice polymorphs to internanoparticle distance, packing density, and surface lattice in assemblies of pbs nanoparticles // *Nano Lett.* 2013. Vol. 13, No 3. P. 1303–1311. doi: 10.1021/nl400084k.

Zaccarelli E. Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes // *J. Phys.: Condens. Matter.* 2007. Vol. 19. P. 323101. doi: 10.1088/0953-8984/19/32/323101.

Поступила в редакцию 10.09.2015

References

Bazarov I. P. Termodinamika [Thermodynamics]. Moscow: Vysshaja shkola, 1983. 344 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 izmenenija 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 javlenija, fazovye ravnovesija i strukturno-temperaturnyj optimum gomeostaza v model'noj sisteme voda-biopolimer-jelektrolit [Critical phenomena, phase equilibria, and structural temperature optimum of homeostasis in the water-biopolymer-electrolyte model system]. *Biofizika.* 2005. Vol. 50, No 2. P. 215–222.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Fazovye sostojanija sistemy voda-belok (polipeptid)-sol' i reakcija na vneshnie faktory sredy [Phase states of water-protein (polypeptide)-salt system and reaction to external environment factors]. *Biophysics.* 2014. Vol. 59, No 1. P. 43–48. doi: 10.1134/S0006350914010175.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Termodinamicheskoe srodstvo k rastvoritelju kak kriterij kriticheskikh temperatur rastvorenija belkovyh makromolekul [Thermodynamic affinity for solvent as a criterion of critical solution temperatures of protein macromolecules]. *Trudy KarNC RAN [Transactions of the KarRC RAS].* 2015. No 12. P. 96–100. doi: 10.17076/eb234.

Asherie N., Pande J., Pande A., Zarutskie J. A., Lomakin J., Lomakin A., Ogun O., Stern L. J., King J., Benedek G. B. Enhanced crystallization of the Cys18 to Ser mutant of bovine gammaB crystallin. *J. Mol. Biol.*

2001. Vol. 314. P. 663–669. doi: 10.1006/jmbi.2001.5155.

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.

Berland C. R., Thurston G. M., Kondo M., Broide M. L., Pande J., Ogun O., Benedek G. B. Solid-liquid phase boundaries of lens protein solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89. P. 1214–1218.

Bromberg L., Rashba-Step J., Scott T. Insulin particle formation in supersaturated aqueous solutions of poly (ethylene glycol). *Biophys. J.* 2005. Vol. 89. P. 3424–3433. doi: 10.1529/biophysj.105.062802.

Charache S., Conley C. L., Waugh D. F., Ugoletz R. J., Spurrell J. R. Pathogenesis of hemolytic anemia in homozygous hemoglobin C disease. *J. Clin. Invest.* 1967. Vol. 46. P. 1795–1811.

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. P. 570–583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152.

Dodson G., Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. Vol. 8. P. 189–194. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80037-7.

Goodfellow B. W., Korgel B. A. Reversible solvent vapor-mediated phase changes in nanocrystal superlattices. *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, No 4. P. 2419–2424. doi: 10.1021/nn201273c.

King J. T., Arthur E. J., Brooks III C. L., Kubarych K. J. Crowding induced collective hydration of biological macromolecules over extended distances. *J. Amer. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136. P. 188–194. doi: 10.1021/ja407858c.

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.

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. Supercritical Fluids*. 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028.

Stradner A., Cardinaux F., Schurtenberger P. A small-angle scattering study on equilibrium clusters in lysozyme solutions. *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110. P. 21222–21231. doi: 10.1021/jp0639804.

Vekilov P. G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions. *J. Phys.: Condens. Matter*. 2012. Vol. 24. P. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101.

Vekilov P. G., Vorontsova M. A. Nucleation precursors in protein crystallization. *Acta Cryst.* 2014. Vol. F70. P. 271–282. doi: 10.1107/S2053230X14002386.

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

Wang Z., Schliehe C., Bian K., Dale D., Bassett W. A., Hanrath T., Klinke C., Weller H. Correlating superlattice polymorphs to internanoparticle distance, packing density, and surface lattice in assemblies of pbs nanoparticles. *Nano Lett.* 2013. Vol. 13, No 3. P. 1303–1311. doi: 10.1021/nl400084k.

Zaccarelli E. Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes. *J. Phys.: Condens. Matter*. 2007. Vol. 19. P. 323101. doi: 10.1088/0953-8984/19/32/323101.

Received September 10, 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