

СТАБИЛЬНЫЕ, МЕТАСТАБИЛЬНЫЕ И ЗАКРИТИЧЕСКАЯ ФАЗЫ В РАСТВОРАХ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ МЕЖДУ ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ ТЕМПЕРАТУРАМИ ИХ ДЕНАТУРАЦИИ

© 2017 г. С.П. Рожков, А.С. Горюнов

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 10.11.16 г.

Температурные зависимости стандартных термодинамических функций нативного и денатурированного белка в растворе рассмотрены в рамках представлений об избыточных функциях смешения. Предполагается, что часть молекул белка в результате специфического взаимодействия с водой принимает промежуточные между нативным и денатурированным состояниями в диапазоне температур между тепловой и холодной денатурацией и образует метастабильные микрофазы. В координатах «температура–стандартная энтропия» предложена фазовая диаграмма в форме семейства изобар. Две предельные изобары характеризуются скачком энтропии, отражающим фазовый переход I рода между нативным и денатурированным состояниями. Изобары в диапазоне промежуточных температур представлены в форме кривых Ван-дер-Ваальса и отражают равновесие между основной фазой с молекулами в нативном состоянии и микрофазами. В критических точках различие между фазами исчезает. Предполагается, что закритическая область – это макроскопически однородная однофазная область с пониженной устойчивостью, которая представляет собой динамическую систему из мономеров и олигомеров нативного белка, мономеров и кластеров белка с частично развернутой структурой. Представленная фазовая диаграмма сопоставляется с фазовой диаграммой эллиптического типа в плоскости «температура–осмотическое давление».

Ключевые слова: конформация белка, денатурация, фазовая диаграмма, кластеры, сверхкритическая фаза, бинадаль.

Изучение белков и их функций обычно базируется на анализе основополагающих физических принципов построения белковых структур и их конформационных превращений под воздействием различных факторов [1]. Однако 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, в частности, и образование кристаллов [2]. В связи с этим фазовые диаграммы (превращения) самих белковых структур могут быть сопоставлены с фазовыми превращениями в растворах белка, ибо последние имеют прямое отношение к проблеме кристаллизации белков [3], возникновения сложной гетерофазной организации растворов (дисперсий) белков в широком диапазоне температур и составов для моделирования клеточной цитоплазмы и био-

технологических процессов [4–6], расшифровки физико-химических механизмов конденсационных заболеваний [7,8].

В настоящее время исследование соотношения конформации белков с возникающей структурной организацией белковых систем в предденатурационной области температур привлекает все большее внимание [9], в связи с чем представление различных типов этой организации на фазовой диаграмме (ФД) белкового раствора также имеет важное значение. Термодинамический механизм тепловой и холодной денатурации, стабилизации нативной структуры белка и кристаллизации изучается уже в течение долгого времени [10–14]. Определенный прогресс в этом направлении достигнут с использованием внешнего давления в качестве термодинамической переменной [15–17]. Показано, что ФД эллиптического типа в координатах «температура–давление» для представления свернутых, развернутых, внутренне неупорядоченных белковых структур оказывается удобной для термодинамического анализа этих явлений. Важными линиями, пересекающими эллипсоид

Сокращения: ФД – фазовая диаграмма, НКТР, ВКТР – нижняя и верхняя критические температуры смешения.

и соединяющими его противоположные точки, соответствующие максимальным значениям давления и температуры, являются разность между денатурированным (D) и нативным (N) состояниями энтропии $\Delta S_N^D = S^D - S^N = 0$ и объема $\Delta V_N^D = V^D - V^N = 0$ соответственно, [15]. В работе [17] предлагается использовать координатную ось, на которой вместо внешнего давления используется давление осмотического стресса, создаваемого присутствием различных осмолитов или водорастворимых полимеров типа полиэтиленгликоля, полиэтиленоксида и т.п.

Вместе с тем в последние два десятилетия заметные усилия были направлены на исследование явлений и механизмов фазовых переходов типа «жидкость–жидкость» в насыщенных растворах белков, обусловленных образованием в растворе белка микроскопических капель жидкости с большей концентрацией белка, чем средняя по объему, а также формирования олигомеров и мезоскопических кластеров белка в закритической области ФД раствора белка [18–22]. В связи с этим для насыщенных растворов глобулярных белков были предложены классические варианты диаграмм фазового равновесия, известных для флюидных систем типа «газ–жидкость» и гетерогенных коллоидных систем [23] с фазовыми переходами 1 рода, заканчивающимися критическим фазовым переходом при определенной температуре и составе. В таком виде ФД позволяет представить фазовые равновесия и фазовые переходы: «жидкость–твердое тело», «жидкость–метастабильная плотная жидкость», «золь–гель», обозначить зону существования мезоскопических динамических кластеров белка и олигомеров [20–22] в закритической области фазовой диаграммы, хотя природа этих надмолекулярных структур пока не вполне понятна.

Ранее мы высказывали предположение [5], что именно в этой области ФД, которая сопряжена с областью критических фазовых переходов, система «вода–белок–соль» в наибольшей степени способна к саморегуляции в ответ на изменения температуры и/или солености среды. Это могло бы служить моделью установления механизмов взаимодействия протеиноидной системы клетки с окружающей средой в реализации основополагающих принципов гомеостаза клеточных систем.

До настоящего времени как экспериментально, так и теоретически в основном анализируются насыщенные растворы белков с верхней критической температурой растворения (смешения) (ВКТР) метастабильной жидкой фазы. Для таких белков растворимость растет с ростом

температуры. В то же время растворы разных белков, исследованные на предмет построения ФД и растворимости, в равной степени представлены системами как с ВКТР, так и нижней критической температурой растворения (НКТР) [19,24]. В последнем случае растворимость растет с понижением температуры. В связи с этим в работе [19] было постулировано существование обобщенной ФД двух типов: одна для глобулярных белков, образующих растворы с ВКТР, а другая – растворы с НКТР. Однако возникает вопрос, могут ли существовать условия, в которых один и тот же тип белка мог бы образовывать системы как с ВКТР, так и с НКТР, как это часто бывает в растворах полимеров [25]. Существует ряд экспериментальных данных [26,27], свидетельствующих, что в растворах белков (альбумина, лизоцима, инсулина), являющихся типичными представителями систем с ВКТР в низкотемпературном диапазоне, в высокотемпературном диапазоне при пониженных значениях рН обнаруживаются фазовые явления, характерные для систем с НКТР. Так, показано, что высокотемпературная денатурация лизоцима сопровождается фазовыми явлениями и может быть описана в рамках трех фазовых границ, разделяющих мономеры, жесткие фибриллы; олигомеры и криволинейные фибриллы, а также преципитат [9]. Однако только система «мономер – жесткие фибриллы» является равновесным термодинамическим состоянием, в то время как другие являются метастабильными состояниями. Это дает возможность использовать подобные белки для моделирования фибриллогенеза [26,27]. Растворы различных гемоглобинов в зависимости от лигандного состояния, степени насыщения кислородом, взаимодействия с фосфатами могут изменять агрегатное (фазовое) состояние как при понижении, так и повышении температуры [28,29]. Таким образом, есть основания полагать, что растворы молекул белка одного и того же типа в зависимости от состава растворителя, рН и/или других условий могут менять свое фазовое состояние как при нагревании, так и охлаждении, и иметь как НКТР, так и ВКТР. Теоретический термодинамический анализ таких систем показывает, что объяснение наличия одновременного НКТР и ВКТР требует учета свойства воды как растворителя [30,31].

Задача данного этапа работы заключается в том, чтобы предложить качественный подход к описанию фазовых состояний и превращений насыщенных белковых растворов в широком диапазоне температур, включая низко- и высокотемпературные области, в которых конфор-

мационное состояние молекул белка, а также межмолекулярное взаимодействие, гидратация и топология возникающих надмолекулярных структур существенно изменяются. Этот подход основан на анализе фазовых диаграмм, включающих НКТР, ВКТР и расположенную между ними закритическую область. Траектория состояний белковых молекул распространяется от состояния холодной денатурации D к термически денатурированному состоянию D^* и от низкотемпературного нативного состояния N к высокотемпературному нативному состоянию N^* , что обсуждается на примере ФД лизоцима в координатах «температура – энтропия» и «температура – осмотическое давление». В основу этих диаграмм положены экспериментальные данные зависимости стандартных энтальпии и энтропии нативного и денатурированного состояния лизоцима от температуры [11] с включением литературных экспериментальных данных о существовании различных надмолекулярных образований в растворах лизоцима в широком диапазоне температур [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Термодинамический тренд стандартных термодинамических функций допускает существование двух критических температур для раствора лизоцима. 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 (D) и нативного (N) белка свидетельствуют о тепловой и холодной денатурации глобулярных белков как фазовых переходах, близких к фазовым переходам 1 рода, которые происходят при $\Delta G_N^D = 0$ (рис. 3 в работе [11]). Максимум на кривой ΔG_N^D в промежутке между точками тепловой и холодной денатурации характеризует максимальную стабилизацию нативной структуры белка в области температур, близких к физиологическим [11]. Однако в силу опосредованного растворителем сопряжения внутри- и межмолекулярных взаимодействий белковых молекул, аналогичные переходы должны присутствовать и на ФД белковых растворов. Это обусловлено 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, олигомеры, агрегаты, фибриллы) упаковок.

Поскольку вода является идеальным растворителем для неполярных органических жидкостей при температурах выше 112°C , в том числе и для неполярных групп белка, считается, что в этих условиях они не должны взаимодействовать с водой [11], т.е. компоненты раствора как бы не смешаны и находятся в своих основных состояниях. Пусть в этих условиях суммы их термодинамических функций – это H^C, S^C, G^C . Микрокалориметрические данные о термодинамических функциях белков в N - и D -состояниях [11] могут быть использованы для построения термодинамических функций смешения: $\Delta H_M^N = H^N - H^C$; $\Delta S_M^N = S^N - S^C$; $\Delta G_M^N = G^N - G^C$ и $\Delta H_M^D = H^D - H^C$; $\Delta S_M^D = S^D - S^C$; $\Delta G_M^D = G^D - G^C$. Тогда избыток изменения термодинамической функции раствора для нативного белка (энтальпии и энтропии) может быть записан как $\Delta H_E^N = \Delta H_M^N - \Delta H_M^D = H^N - H^D$; $\Delta S_E^N = \Delta S_M^N - \Delta S_M^D = S^N - S^D$, а для раствора денатурированного белка как $\Delta H_E^D = \Delta H_M^D - \Delta H_M^N = H^D - H^N$ и $\Delta S_E^D = \Delta S_M^D - \Delta S_M^N = S^D - S^N$.

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

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

а в растворе денатурированного белка при температуре:

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

Известно [11], что энтальпия и энтропия нативного состояния белка при достаточно низких температурах превышают энтальпию и энтропию денатурированного состояния. По мере роста температуры эти функции меняют знак, причем энтальпия переходит через ноль при более низкой температуре, что схематически показано на рис. 1.

Из уравнения (1) следует, что температуры фазового перехода определены при условии: (1) $\Delta H_E^N > 0$; $\Delta S_E^N > 0$ и (2) $\Delta H_E^D < 0$; $\Delta S_E^D < 0$. Анализ рис. 1 показывает, что условие (1) выполняется слева от точки пересечения функций H^D и H^N , т.е. при низких температурах, а условие (2) выполняется справа от точки пересечения S^D и S^N – при высоких температурах. Известно, что характер изменения избыточных энтальпии и энтропии с температурой указывает на тип критической температуры раство-

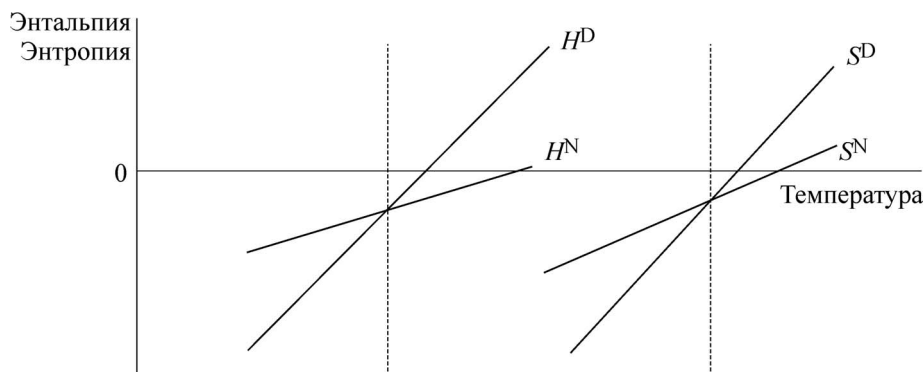


Рис. 1. Схема, представляющая типичную экспериментальную температурную зависимость поведения стандартной энтропии (S) и энтальпии (H) денатурированного (D) и нативного (N) белка лизоцима [11].

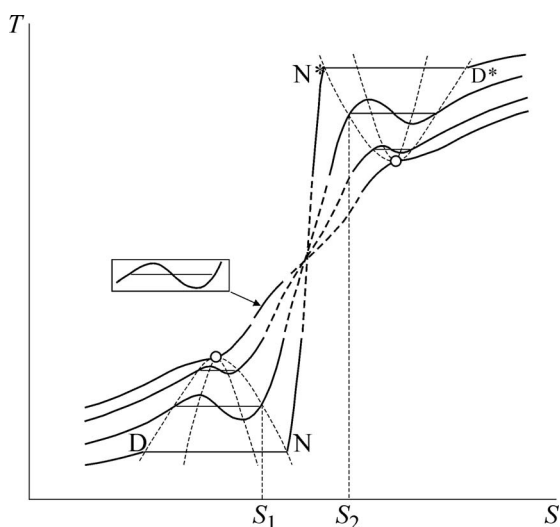


Рис. 2. Схематическое представление ФД лизоцима в координатах $\{TS\}$. Нижняя и верхняя горизонтальные линии на изобарах между N и D , N^* и D^* отражают фазовые переходы 1 рода между состояниями белка. Изобары в форме петли Ван-дер-Ваальса при низких и высоких температурах соответствуют метастабильным фазовым равновесиям между нативным и частично денатурированным состояниями. Пересекающиеся изобары в промежуточном диапазоне температур (пунктиры) соответствуют сверхкритической мезофазе коллоидного типа, содержащей нативные мономеры и олигомеры, частично денатурированные мономеры и их кластеры, находящиеся в динамическом равновесии.

рения [25]. Соответственно, в рассматриваемом случае ВКТР должна быть при низких температурах, а НКТР – при высоких, а между ними, в области физиологических температур, – однофазная область раствора.

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 рис. 1 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 N -, так и D -белка, однако их взаиморасположение различается для двух состояний белка.

Фазовая диаграмма лизоцима в координатах «температура–энтропия». Качественно представим раствор N - и D -молекул белка 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», где должен отчетливо проявляться скачок энтропии при фазовом переходе 1 рода. Вид этих кривых может быть представлен только качественно, ибо даже для газа Ван-дер-Ваальса не удается получить функции состояния.

На рис. 2 на основании качественно представленных экспериментальных данных (рис. 1) о поведении энтропии [11] представлена обобщенная ФД раствора белка в координатах «температура–энтропия» в виде семейства изобар, где фазовому переходу 1 рода белка $D \leftrightarrow N$ и соответствующим переходам в растворе соответствуют скачки энтропии (горизонтальные участки). Эта изобара соответствует наименьшему значению температуры на эллиптической ФД в координатах «температура–давление» (рис 2.3 в работе [15]) и условию $\Delta V_N^D = V^D - V^N = 0$. Поскольку часто предельным случаем фазового перехода 1 рода является критический переход, который сопряжен с исчезновением метастабильной фазы (в нашем случае перехода

типа «жидкость–жидкость»), изобары могут быть представлены не плоским участком, а петлями типа «петли» Ван-дер-Ваальса, которыми обычно характеризуют переходы «газ–жидкость». При этом существуют изобары критического ($\Delta S_N^D = S^D - S^N = 0$) и закритического типа. В критической точке отсутствует различие между нативным и частично денатурированным состояниями белка, так же как и различие между фазами раствора, состоящими из этих молекул. На ФД в координатах «температура–давление» этому состоянию соответствует минимальное давление (рис 2.3 в работе [15]). Каждой изобаре соответствует свое давление (в том числе осмотическое), которое зависит от концентрации белка и других компонентов – осмолитов, присутствующих в растворе.

Наличие семейства изобар с «петлями» Ван-дер-Ваальса может быть сопряжено с наличием различных метастабильных топологических структур раствора. При этом каждому выделенному конформационному состоянию молекулы белка может 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 приводить к образованию различающихся по плотности упаковки нанокристаллических суперрешеток [32] и таким образом приводить к кристаллическому полиморфизму [33], влияющему на фазовые свойства раствора.

Наличие критических изобар на рис. 2 и метастабильных состояний имеет прямое отношение к термодинамической устойчивости системы [34,35]. Граница термодинамической устойчивости раствора белка по отношению к процессам диффузии (к росту флуктуаций концентрации, предшествующих фазовому разделению) может быть определена из условия $\det|\delta^2 G| = 0$, 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). То есть в данном случае экстремумы изобар $\partial T/\partial S = 0$ определяют спинодаль ФД, а ноды, соединяющие противоположные стороны «петли» Ван-дер-Ваальса – бинодаль ФД, аналогичные спинодали и бинодали на общей ФД белковых растворов в координатах температура – концентрация [9,10]. Разница заключается в том, что концентрация белка яв-

ляется термодинамическим параметром, пропорциональным осмотическому давлению, от которого зависит конформация и плотность упаковки белковых молекул в соответствующую «нанокристаллическую суперрешетку».

Обычно считается, что критическая и закритическая области ФД являются стабильной макроскопически однородной фазой с пониженной термодинамической устойчивостью [35]. Однако на микроскопическом уровне флюид представляет собой динамическую коллоидную систему, содержащую мономеры, олигомеры и кластеры молекул [36]. Поскольку для D-состояния белка область между критическими точками на рис. 2 двухфазна, то на критической изобаре (пунктир) также может существовать «петля» Ван-дер-Ваальса, допускающая возможность наличия квазиспинодали, квазибинодали и метастабильных состояний белка [22,37] с конформацией молекул, промежуточной между D- и N-состояниями, в форме мезоскопических белковых кластеров, а также динамически замороженных состояний в виде белкового преципитата. Вероятно, следует учесть также наличие закритических изобар, которые идут в обход критической точки и отражают непрерывные $D \leftrightarrow D^*$ и $D \leftrightarrow N^*$; $N \leftrightarrow N^*$ и $N \leftrightarrow D^*$ температурные фазовые переходы между топологическими структурами раствора с изменением параметра порядка [15].

ОБСУЖДЕНИЕ

Возможная связь между состоянием молекулы белка и фазовым состоянием раствора белка. Скачкообразное изменение энтропии на рис. 2, соответствующее $N \leftrightarrow D$ и $N^* \leftrightarrow D^*$ фазовым переходам молекул белка, может проявляться как фазовый переход типа «жидкость–жидкость» в растворе белка. Из рис. 1 следует, что термодинамические функции, описывающие N-, D-, N*-, D*-состояния белка, различаются вне промежутка $\Delta S_N^D = 0$. Следовательно, химический потенциал N- и D-, N*- и D*-молекул также может быть различен. Это означает, что раствор мономеров N- и D-молекул не находится в равновесии вне условия $\Delta G = 0$, соответствующего фазового перехода 1 рода. Если предположить, что они находятся в равновесии, то энергия Гиббса ($G = U + PV - TS$) тех и других молекул должна быть равна: $TS_D - U_D - P_D V_D = TS_N - U_N - P_N V_N$. Область минимальных температур на окружности эллипсоида, представляющего ФД белка в координатах «температура–давление», соответствует условию $\Delta V \approx 0$, но при этом ΔS имеет отрица-

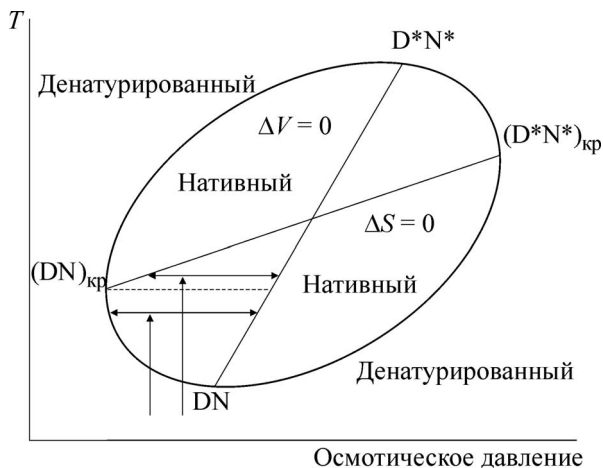


Рис. 3. Схематическое представление нативных и денатурированных состояний молекул белка на ФД в координатах температура – осмотическое давление в форме скошенного эллипсоида. Сегмент $\{(DN)_{кр}; DN\}$ отражает низкотемпературные метастабильные состояния, а сегмент $\{D^*N^*; (D^*N^*)_{кр}\}$ – высокотемпературные состояния. $\Delta S = 0$ соответствует критическим и за критическим фазовым переходам; $\Delta V = 0$ соответствует фазовому переходу 1 рода между нативным и денатурированным состояниями, а сегменты выше и ниже этой линии – непрерывным $D \leftrightarrow D^*$ и $D \leftrightarrow N^*$; $N \leftrightarrow N^*$ и $N \leftrightarrow D^*$ фазовым переходам (плавные конформационные изменения).

тельные значения (рис. 1). Отсюда следует (в предположении, что внутренняя энергия того и другого состояния отличается незначительно: $U_N \approx U_D$), что $-T\Delta S \approx V(P_D - P_N) < 0$. В области максимальных температур эллипсоида $\Delta V \approx 0$, но ΔS является положительной величиной. При этом $T\Delta S \approx V(P_D - P_N) > 0$. Следовательно, условие механического равновесия $P_D = P_N$ не соблюдается. Для гидратированных D- и N-молекул белка разность P_D и P_N можно представить как капиллярное давление $P \sim \sigma/(r_D + r_N)$, где σ – поверхностное натяжение (удельная поверхностная энергия) и r – эффективный радиус молекулы белка. Это давление должно быть скомпенсировано расклинивающим давлением между молекулами. Если это сопряжено с ростом энергии Гиббса, то капиллярное давление может заставить молекулы, различающиеся по конформации, объединиться в отдельные фазы. Теория капиллярных сил и расклинивающего давления для наноразмерных частиц пока разработана недостаточно, однако эксперимент показывает, что в растворах глобулярных белков при температурах, близких к денатурационному переходу, действительно образуются микроскопических размеров капли (фазы) более плотной жидкости

как результат фазового перехода «жидкость–жидкость» [18–20].

Другими словами, поскольку молекулы белка в D-состоянии характеризуются большей поверхностью взаимодействия с растворителем, избыточная поверхностная энергия может быть скомпенсирована при объединении таких молекул в отдельную фазу [38]. Поэтому можно предположить, что нативные и частично денатурированные молекулы не существуют как их равновесная смесь, но они организуются в фазы, содержащие молекулы в соответствующем состоянии. При этом не обязательно, чтобы химические потенциалы молекул белка были одинаковы в этих фазах. Для метастабильного равновесия может потребоваться, чтобы химические потенциалы молекул воды в этих фазах были равны [38,39], так как именно они и определяют потенциал Гиббса фазы.

Условие механического равновесия молекул белка в N-состоянии в основной фазе и микрофаз радиуса R_2 , содержащих молекулы белков в частично денатурированном состоянии, можно представить как:

$$P(\sigma/R_1)_N = P(\sigma/R_2)_D + P_{dis}, \quad (3)$$

где σ – удельная поверхностная энергия, а P_{dis} является расклинивающим давлением в прослойке воды между молекулами и микрофазами. Это давление является аналогом осмотического давления и может изменяться под влиянием внешнего давления или в присутствии дополнительных молекул, создающих осмотический стресс, влияющий на коллоидные силы: молекулярные, ион-электростатические, структурные, известные из теории Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека. Метастабильные микрофазы гидратированных частично нативных молекул могут появляться в непрерывной начальной фазе денатурированных молекул или микрофазы гидратированных частично денатурированных молекул могут возникать в непрерывной фазе нативного белка вблизи фазового перехода 1 рода. Величина и знак капиллярного давления могут изменяться в сопряжении с изменением радиуса кривизны возникающих микрофаз и вызывать соответствующие изменения расклинивающего (осмотического) давления.

Фазовая диаграмма раствора белка в координатах «температура–осмотическое давление». ФД в плоскости «температура–давление» в форме скошенного эллипсоида [15] отражает состояние белка, свернутое (внутри) или развернутое (вне эллипсоида). Положение изобар на рис. 2, соответствующих равновесию $N \leftrightarrow D$ и $N^* \leftrightarrow D^*$, представлено точками на противо-

ложных сторонах эллипсоида, которые соединены линией $\Delta V = 0$ (рис. 3) Метастабильные состояния раствора представляются как сегменты эллипсоида, ограниченные линиями $\Delta S = 0$ и $\Delta V = 0$. Левая критическая точка $(DN)_{кр}$ соответствует минимальному осмотическому давлению P_{dis} в соответствии с уравнением (3), поскольку по условию критической точки из-за флуктуаций отсутствует различие между N- и D-молекулами и фазами, а осмотическое давление определяется концентрацией молекул белка: $\Pi \approx RTc_2$.

Поскольку рассматриваются насыщенные растворы белков, далекие от идеальных из-за взаимодействия, а также возможное присутствие в растворе осмолитов, следует учитывать вириальный коэффициент B осмотического давления $\Pi \approx RTc_2(1/M_2 + Bc_2)$, где c_2 – концентрация белка, а M_2 – молекулярный вес. Коэффициент B может быть как положительным, так и отрицательным. Известно, что высокий заряд, малая концентрация электролита, анизометрическая форма молекул приводит к положительным значениям B , в то время как в условиях ухудшения растворимости (высокие концентрации соли, эффекты деплеций) наблюдаются отрицательные значения B . Весьма вероятно, что правая критическая точка $(D^*N^*)_{кр}$, которая также соответствует условию отсутствия различия между N*- и D*-молекулами и фазами, располагается при больших значениях осмотического давления, поскольку денатурированные теплом молекулы обычно приобретают вытянутые стержнеобразные конфигурации, способствующие формированию фибрилл. Осмотическое давление между такими молекулами будет выше за счет большого положительного второго вириального коэффициента B .

На рис. 3 левая вертикальная стрелка, пересекающая сегмент эллипсоида $\{(DN)_{кр}; DN\}$, соответствуют определенному значению осмотического давления, которое учитывает давление в основной фазе, состоящей из нативных молекул белка, и капиллярного давления в более плотных микрофазах, содержащих частично денатурированные молекулы белка. Это метастабильное равновесие типа «жидкость–жидкость» показано горизонтальной двухсторонней стрелкой в сегменте $\{(DN)_{кр}; DN\}$ при температурах ниже критической.

Горизонтальная правая двухсторонняя стрелка в сегменте $\{(DN)_{кр}; DN\}$ при температурах выше критической точки обозначает динамическое равновесие основной фазы, состоящей из нативных мономеров и наноразмерных кластеров частично денатурированного белка.

В целом это состояние выглядит как отдельная макроскопически гомогенная мезофаза со специфическими термодинамическими особенностями [35].

Подобное описание может быть предложено и для сегмента $\{D^*N^*; (D^*N^*)_{кр}\}$ в высокотемпературной области ФД.

Структурная организация раствора белка. Попробуем представить возможные типы структурной организации раствора глобулярного белка и их изменения в зависимости от температуры и осмотического давления.

Упорядочивание воды неполярными группами белка при пониженных температурах ведет к образованию водных клатратоподобных структур, которые оказывают расклинивающее действие на неполярные группы белка и способствуют формированию развернутой структуры белка. При повышении температуры такие структуры разрушаются и силы Ван-дер-Ваальса стремятся придать молекулам белка нативную конформацию. В условной точке фазового перехода 1 рода удельный объем нативных и денатурированных молекул сравнивается $\Delta V = 0$. По завершении перехода при более высоких температурах фаза нативного белка становится доминирующей, однако существующая анизотропия взаимодействия белок-растворитель приводит к тому, что часть молекул белка может оставаться в частично-развернутом состоянии. При этом повышенный химический потенциал будет вынуждать такие молекулы группироваться и объединяться в метастабильные микрофазы, если их концентрация достигает условной линии бинодали на фазовой диаграмме. Из экспериментов известно, что в таких микрофазах, образующихся как результат фазового перехода типа жидкость–жидкость, концентрация белка повышена. Вследствие этого из-за усиления межмолекулярных взаимодействий в таких микрофазах можно ожидать изменение конформации в сторону более свернутого состояния, что, вероятно, способствует возникновению зародышей кристаллической фазы, поскольку эти микрофазы метастабильны по отношению к кристаллической фазе. С ростом температуры таких микрофаз становится меньше и их размер также уменьшается.

В критической точке $\Delta S = 0$ сильно развиты флуктуации плотности, и различие между основной фазой и микрофазами исчезает, так же как и различие между конформациями белка. Выше температуры критической точки, в закритической области существует макроскопически гомогенная фаза с преимущественно нативными белками. Вместе с тем на нанораз-

эта фаза не является гомогенной, а ее пониженная термодинамическая устойчивость сопряжена с тем, что она содержит динамические кластеры с частично развернутыми молекулами белка, малую долю таких же мономеров, нативные белки и их агрегаты (олигомеры). Мезофазы характерны для жидкокристаллических систем, поэтому не исключено, что динамические кластеры имеют жидкокристаллическую природу за счет остаточной гидратации, существовавшей при более низких температурах. Такие гидратные структуры могут формироваться или сохраняться в замкнутых пространствах или в условиях краудинга при повышенных температурах за счет коллективной гидратации макромолекул, распространяющейся на несколько нанометров [40]. В таких кластерах возможно образование зародышей кристаллической фазы, однако они могут иметь несколько иной тип кристаллической решетки и иную морфологию по сравнению с кристаллами, возникающими в низкотемпературных фазах.

С дальнейшим ростом температуры может происходить полимеризация молекул в кластерах с образованием криволинейных фибрилл [15,22], так же как и образование олигомеров белка с нативной конформацией N*. По мере дальнейшего повышения температуры происходит накопление подобных динамических структур, которые при температурах, выше нижней критической, соответствующей $\Delta S = 0$, обособляются в форме метастабильных микрофаз олигомеры–криволинейные фибриллы [15] и могут рассматриваться как результат высокотемпературного фазового перехода типа жидкость–жидкость.

В непрерывной фазе нативного N*-белка предденатурационные изменения приводят к накоплению молекул белка в денатурированном состоянии, которые образуют линейные фибриллы. Условию $\Delta V = 0$ соответствует высокотемпературный фазовый переход 1 рода, отражающий равновесие между N*- и D*-состояниями белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует значительный интерес к исследованию структурно-конформационных изменений биомолекул при повышенных температурах и/или под действием денатурантов в связи с процессами агрегации и фибрилlogenеза, однако часто эти явления рассматриваются как кинетические процессы. В своей работе мы исходим из предположения, что это явления во многом имеют термодинамическую природу и могут быть объяснены с учетом фазовых диа-

грамм белковых растворов. В связи с этим предложена обобщенная фазовая диаграмма белкового раствора в широком диапазоне температур, которая рассматривает последовательные конформационные превращения молекул белка под действием температуры как фазовые переходы их растворов различного типа, от фазовых переходов 1 рода до непрерывных и закритических. При этом весьма интересной представляется закритическая зона – область ФД между ВКТР и НКТР, где наравне с мономерами и олигомерами белка, находящихся преимущественно в N-конформации, существуют мезоскопические кластеры белка, в которых молекулы белка имеют конформационное состояние, более близкое к D-состоянию, и формируют структуры жидкокристаллического типа. Вместе с тем процессы, происходящие в этой зоне, могут служить моделью физико-химического состояния белковой части клеточной протоплазмы, которую следует рассматривать в сопряжении с аналогичным состоянием межклеточной жидкости, в силу их совместных возможностей в регуляции гомеостаза в ответ на изменение температуры или состава системы [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. В. Финкельштейн и О. Б. Птицын, *Физика белка: курс лекций*, 2-е изд. (Книжный дом «Университет», М., 2002).
2. Р. Ламри и Р. Билтонен, в сб. *Структура и стабильность биологических макромолекул*, под ред. М. В. Волькенштейна (Мир, М., 1973), сс. 7–167).
3. A. Sauter, F. Roosen-Runge, F. Zhang, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **137**, 1485 (2015).
4. M. Feig and Y. Sugita, *J. Molec. Graphics and Modelling* **45**, 144 (2013).
5. С. П. Рожков и А. С. Горюнов, *Биофизика* **59**, 43 (2014).
6. T. Nicolai and D. Durand, *Curr. Opin. in Colloid & Interface Science* **18**, 249 (2013).
7. F. Bemporad and F. Chiti, *Chemistry and Biology* **19**, 315 (2012).
8. N. Golub, A. Meremyanin, K. Markossian, et al. *FEBS Lett.* **581**, 4223 (2007).
9. T. Miti, M. Mulaj, J. D. Schmidt, et al., *Biomacromolecules* **16**, 326 (2015).
10. K. P. Murphy, P. L. Privalov, and S. J. Gill, *Science* **247**, 559 (1990).
11. П. Л. Привалов, *Биофизика* **32**, 742 (1987).
12. K. Ghosh and K. A. Dill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 10649 (2009).
13. L. Sawle and K. Ghosh, *Biophys. J.* **101**, 217 (2011).
14. A. D. Robertson and K. P. Murphy, *Chem. Rev.* **97**, 1251 (1997).

15. L. Smeller, in: *High pressure bioscience. Basic concepts, Applications and Frontiers*, Ed. by K. Akasaka and H. Matsuki (Springer Science + Business media, Dordrecht, 2015), pp. 19–39.
16. J. Wiedersich, S. Kohler, A. Skerra, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5756 (2008).
17. A. Badasyan, Y. Sh. Mamasakhlov, R. Podgornik, et al., *J. Chem. Phys.* **143**, 014102 (2015).
18. J. A. Thomson, P. Schurtenberger, G. M. Thurston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7079 (1987).
19. M. Muschol and F. Rozenberger, *J. Chem. Phys.* **107**, 1953 (1997).
20. A. C. Dumetz, A. M. Chockla, E. W. Kaler, et al., *Biophys. J.* **94**, 570 (2008).
21. S. P. Rozhkov and A. S. Goryunov, *Biophys. Chem.* **151**, 22 (2010).
22. P. G. Vekilov, *J. Physics: Condens. Matter* **24**, 193101 (2012).
23. E. Zaccarelli, *J. Phys.: Condens. Matter* **19**, 323101 (2007).
24. S. Grouazel, F. Bonnete, J.-P. Astier, et al. *J. Phys. Chem. B* **110**, 19664 (2006).
25. A. A. Тагер, *Физическая химия полимеров* (Научный мир, М., 2007).
26. J. Juarez, P. Taboada, S. Goy-Lopez, et al., *J. Phys. Chem. B* **113**, 12391 (2009).
27. V. K. Ravi, T. Swain, N. Chandra, et al., *PLOS One* **9**, e87256 (2014).
28. Q. Chen, P. G. Vekilov, R. L. Nagel, et al., *Biophys. J.* **86**, 1702 (2004).
29. J. Han and J. Herzfeld, *Biopolymers* **45**, 299 (1998).
30. С. П. Рожков, *Журн. физ. химии* **70**, 1836 (1996).
31. A. Shirayayev, D. L. Pagan, J. D. Gunton, et al., *J. Chem. Phys.* **122**, 234911 (2005).
32. B. W. Goodfellow and B. A. Korgel, *ACS Nano* **5**, 2419 (2011).
33. Zh. Wang, C. Schliehe, K. Bian, et al., *Nano Lett.* **13**, 1303 (2013).
34. И. Пригожин и Р. Дефей, *Химическая термодинамика* (Наука, Новосибирск, 1966).
35. И. П. Базаров, *Термодинамика* (Выш. шк., М., 1983).
36. L. V. Woodcock, in *Proc. Intern. Conf. on Properties of Water and Steam* (University Greenwich, London, 2013).
37. S. P. Rozhkov and A. S. Goryunov, *J. Supercritical Fluids* **95**, 68 (2014).
38. С. П. Рожков, *Биофизика* **46**, 53 (2001).
39. С. П. Рожков, *Биофизика* **42**, 1020 (1997).
40. J. T. King, E. J. Arthur, C. L. Brooks, III, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **136**, 188 (2014).

Stable, Metastable and Supercritical Phases in Solutions of Globular Proteins between Low and High Denaturation Temperatures

S.P. Rozhkov and A.S. Goryunov

*Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences,
Pushkinskaya ul. 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

Temperature trends of the standard thermodynamic functions of native and denatured lysozyme in solution have been considered within the framework of the concept of excessive mixing functions. It is assumed that some protein molecules form metastable microphases while in the intermediate between native and denatured states due to a specific interaction with water within the thermal to cold denaturation temperature range. A phase diagram in temperature - standard entropy coordinate plane representing an isobar family has been proposed. The two marginal isobars are characterized by entropy jump reflecting 1st order phase transition between native and denatured states. The isobars in the intermediate temperature range represent Van-der-Waals curves, which reflect equilibrium between the main phase of protein molecules in native state and microphases. The difference between the phases disappears at the critical point. It is assumed that the supercritical range is a macroscopically homogeneous single-phase zone of reduced stability. This is a dynamical system of monomers and oligomers of the native protein, monomers and clusters of partially unfolded proteins. The presented phase diagram has been collated with the elliptic phase diagram in temperature-osmotic pressure plane.

Keywords: protein conformation, denaturation, phase diagram, clusters, supercritical phase, binodal