

УДК 577.3

ВОЗМОЖНЫЕ ФАЗОВЫЕ ЭФФЕКТЫ В ДИСПЕРСИИ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА В ДИАПАЗОНЕ ТЕМПЕРАТУР НАТИВНОГО СОСТОЯНИЯ

© 2022 г. С.П. Рожков*, А.С. Горюнов*

*Институт биологии КарНЦ РАН, Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, 185910, Россия

E-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 08.08.2022 г.

Предложен качественный подход к механизму возникновения фазовых переходов и равновесий разного типа в дисперсиях глобулярного белка в диапазоне температур, где структурное состояние белка считается нативным. Предполагается, что возможны два типа нативных конформеров N и N^* , имеющих максимумы стабильности в разных температурных диапазонах, но между которыми существует обратимый структурный переход. Также предполагается наличие двух типов интермедиатов белка I и I^* , сосуществующих с конформерами N и N^* в соответствующих диапазонах температур. Обсуждается вопрос о поиске возможных путей перехода от термодинамики (пред)денатурационных переходов белка к термодинамике конденсационных фазовых переходов всей дисперсии в целом, с формированием фазовых границ. Предполагается, что интермедиаты I и I^* могут участвовать в фазовых переходах типа «жидкость–жидкость» (L-L), с образованием из них микрофаз (кластеров) в метастабильном равновесии с фазой раствора, состоящей из нативных конформеров. Наступление фазовых переходов зависит как от микроокружения макромолекул белка в дисперсии, так и от свойств интермедиатов белка. На фазовых диаграммах, построенных в координатах «температура–энтропия» $\{T, S\}$, «химический потенциал конформеров – температура» $\{\mu^i, T\}$, определены зоны метастабильных состояний $N \leftrightarrow I$ и $N^* \leftrightarrow I^*$, верхняя и нижняя критические температуры растворения, зона сверхкритических фазовых переходов. Обсуждаются условия, при которых метастабильные равновесия $N \leftrightarrow I$ и $N^* \leftrightarrow I^*$ являются результатом фазовых переходов типа (L-L). Установлено, что максимальная стабильность белка достигается именно в области критических фазовых переходов. Эта область является гомогенной, но характеризуется как зона пониженной термодинамической устойчивости дисперсии белка в целом.

Ключевые слова: химический потенциал, конформация, интермедиаты, кластеры, фазовые переходы, фазовая диаграмма.

DOI: 10.31857/S0006302922060047, EDN: LJFWJL

Проблемы конформации и саморегуляции в белковых системах, равно как и связанных с ними фазовых переходов (ФП) I рода между нативными (N) и денатурированными (D) состояниями, являются предметом интенсивных исследований [1]. В то же время пока еще недостаточно рассматривается роль конформации белка в таких, например, ФП в дисперсиях глобулярных белков, как ФП типа «жидкость–жидкость» (ФП L-L) [2], что обычно наблюдаются в температурном интервале стабилизации нативной формы белка и подробно изучаются в связи с проблемами кристал-

лизации [3]. Вместе с тем известно, что основными участниками физиологически значимых ФП L-L в цитоплазме являются конформационно лабильные внутренне неупорядоченные белки [4–7]. В связи с этим возникает вопрос, в какой мере конформационная лабильность белка способствует наступлению и определяет параметры ФП в белковом растворе. Один из способов ответить на него состоит, на наш взгляд, в том, чтобы проследить взаимосвязь между термодинамикой (пред)денатурационных переходов белка и термодинамикой конденсационных фазовых переходов всей дисперсии (раствора) в целом. Это позволило бы тем самым установить взаимосвязь различных уровней организации – от внутримолекулярного до уровня водно-белковой системы (раствора, дисперсии), поскольку все эти процес-

Сокращения: ФП – фазовые переходы, N – нативный, D – денатурированный, ФП L-L – фазовые переходы типа «жидкость–жидкость», НКТР – нижняя критическая температура растворения, ВКТР – верхняя критическая температура растворения.

сы регулируются однотипными физическими и химическими молекулярными взаимодействиями [8].

ФП типа L-L обычно связаны с образованием плотных белковых микрофаз – кластеров, находящихся в метастабильном равновесии с разбавленным белковым раствором. Плотные микрофазы содержат около тысячи белков и возникают в области температур L-L-переходов. Их образование объясняется механизмами коллоидных взаимодействий, обусловленных короткодействующим потенциалом притяжения и дальним потенциалом отталкивания между молекулами белка [3]. Существуют экспериментальные данные о зависимости критических температур ФП L-L от концентрации белков, различных солей [9] и других осмолитов в дисперсии [10]. Теоретический опыт изучения ФП L-L с критической точкой (при критическом составе и температуре) был сконцентрирован на относительно простых белковых модельных системах типа «вода–глобулярный белок» [3] и «вода–белок–соль» [11]. В последнем случае для такой тройной системы было получено теоретическое выражение критического состава, соответствующего критической температуре. Критический состав определялся отношением молярных концентраций белка и соли m_2/m_3 и зависел от заряда белка, числа адсорбированных белком ионов электролита, коэффициента активности соли [11]. При определенном значении m_2/m_3 на фазовой диаграмме предсказывалось возникновение критического ФП между плотной и разбавленной фазами. В результате этого перехода должна появляться устойчивая макроскопически однородная дисперсия. Критическое значение m_2/m_3 может означать, что определенное количество ионов соли должно взаимодействовать с молекулой белка и занимать соответствующие места в структуре белка. Регулировка может осуществляться как путем подгонки температуры к составу, так и состава к температуре. При отсутствии необходимого соотношения могут возникать белковые фракции с разным количеством адсорбированных ионов, отличающиеся по конформации, гидратации, удельному объему и значениям химического потенциала. Существование различных белковых фракций способствует дестабилизации гомогенного состояния дисперсии [12] и тем самым допускает возможность разделения фаз за счет выделения молекул с более высоким химическим потенциалом в отдельные микрофазы. В этом случае последние могут служить причиной возникновения кристаллического полиморфизма [13].

Если растворимость глобулярного белка снижается с повышением температуры, то их растворы имеют нижнюю критическую температуру

растворения (НКТР). Существует и другая группа белков, которые лучше растворяются при повышении температуры и имеют верхнюю критическую температуру растворения (ВКТР). Считается, что последовательность аминокислот определяет характер растворимости и конденсации. Однако большое число полимеров, частным случаем которых являются белки, могут иметь и ту и другую температуры [14]. В последнее время наблюдается прогресс в дизайне внутренне неупорядоченных белков, растворы которых обладают как НКТР, так и ВКТР, т.е. способных к конденсации как при нагревании, так и при охлаждении [15]. С другой стороны, в зависимости от микроокружения, которое определяется составом и значениями pH дисперсии (зарядом белка), концентрациями и типами электролита, осмолитов и т. д., дисперсия как с ВКТР, так и с НКТР может быть образована одним и тем же белком. Примером такого белка может служить сывороточный альбумин, имеющий ВКТР в присутствии полиэтиленгликолей или ряда неорганических солей в диапазоне пониженных, но положительных температур [16], и имеющий НКТР в области более высоких температур в присутствии поливалентных солей [17].

В данной работе мы рассматриваем низкотемпературный (D) \leftrightarrow (N) и высокотемпературный (D) \leftrightarrow (N)* конформационные переходы белка как ФП первого рода, хотя первый из них обычно имеет место в диапазоне отрицательных температур. При этом исходим из представления, что низкотемпературное D и высокотемпературное D* состояния белка хотя и похожи, но не идентичны, поскольку вторичные структуры отличаются динамикой и гидратацией [18].

С другой стороны, есть факты о существовании двух стабильных конформеров белка в области физиологических температур, которые мы назовем N- и N*-конформерами. Первый из них имеет максимум стабильности в области более низких, а второй – в области более высоких температур. Так, бычья карбоангидраза имеет два свернутых конформера с температурой перехода между ними около 30°C. При этом второй конформер переходит в состояние расплавленной глобулы при нагревании [19]. Предполагается [20], что две свернутые N- и N*-формы белка характерны для многих ферментов. При этом существуют данные о конкретных структурных различиях стабильных конформеров [21].

В работе [22] было показано, что бычий сывороточный альбумин находится в одном конформационном состоянии А в интервале температур 12–20°C, а в интервале температур 22–50°C – в двух различных конформационных состояниях А и В. Процент содержания конформации А уменьшался, в то время как процент содержания кон-

формации В увеличивался примерно до 25% при приближении температуры к 50°C. Бычий сывороточный альбумин спонтанно переходил из конформационного состояния А в конформационное состояние В при температуре около 58°C.

Ранее нами по результатам исследования методом ЭПР спиновой метки структурно-динамических свойств сывороточного альбумина человека в водно-солевых дисперсиях также были выявлены два температурных диапазона максимальной стабильности нативного состояния белка [23, 24].

Таким образом, в некоторой области температур существуют два типа взаимопревращающихся стабильных конформеров, которые, наиболее вероятно, отличаются по растворимости в зависимости от температуры. Их температурный переход А↔В, видимо, можно отнести к явлению, которое классифицируется в термодинамике как непрерывный фазовый переход, связанный с изменением симметрии системы без скачков термодинамических функций, а лишь с их плавным изменением [25].

Кроме того, для многих белков наряду с нативным состоянием обнаруживаются различные долгоживущие интермедиаты [26], причем их концентрация иногда может быть значительной. Естественно предположить, что они являются более лабильными, чем нативная форма, но менее лабильными, чем развернутая форма. Мы допускаем, что некоторые из интермедиатов (I*) имеют более высокую растворимость и концентрацию в высокотемпературном диапазоне, образуя соответствующую фракцию белка, а некоторые интермедиаты (I) имеют более высокую растворимость и концентрацию в низкотемпературном диапазоне и образуют там свою фракцию. Не исключено, что они способны менять структурное состояние при смене температурных диапазонов.

Помимо растворимости, различие N- и I-конформеров белка, равно как N*- и I*-конформеров, может быть сопряжено с различием их объема и химических потенциалов. Так, известно, что объем нативного состояния больше, чем денатурированного из-за образования некоторого количества заполненных растворителем пустот в структуре нативного белка [27]. При некоторой величине этого различия термодинамическая устойчивость дисперсии нарушается и запускается процесс фазового разделения. При этом метастабильное равновесие может устанавливаться за счет высвобождения молекул с повышенным химическим потенциалом в отдельные микрофазы в результате ФП типа «жидкость—жидкость». Если же структурно-динамические различия между N- и I-молекулами или N*- и I*-молекулами уменьшатся при изменении температуры или состава системы, то возможен критический ФП, ведущий

к образованию относительно стабильной макрогомогенной системы из смеси N-, N*-, I- и I*-молекул без фазовых границ.

В данной работе ставится задача качественного описания термодинамической системы в представлении фазовых диаграмм, в которой фазовые переходы первого рода молекул (D)*↔(N)* и (D)↔(N) приняты за реперные точки, в температурном интервале между которыми существуют белковые фракции из (N + I)- и (N* + I*)-молекул. В диапазоне некоторых температур может оказаться энергетически выгодно их фазовое разделение с установлением метастабильного равновесия. Вместе с тем в других, также определенных условиях, происходят критические ФП между этими фазами с формированием макроскопически однородной системы, в которой на микрокопическом уровне возможны последовательные изменения конформации всех компонентов системы. Это состояние характеризуется сильным развитием флуктуаций концентрации конформеров при макроскопической гомогенности дисперсии.

Для характеристики этих переходов и метастабильных равновесий предлагается рассмотреть фазовые диаграммы в координатах температурных изменений энтропии S, концентрации и химических потенциалов μ^i различных состояний белка, где $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$ – соответствующие конформеры.

ТЕОРИЯ

Кривая стабильности белка. Как следует из колоколообразной формы кривой стабильности белка, стабилизация нативного состояния N происходит при положительных значениях разности свободной энергии $\Delta G_N^D = G^D - G^N$ между денатурированным состоянием белка D и нативным состоянием N [28]. Температуры, при которых $\Delta G_N^D = 0$, соответствуют ФП первого рода. Ниже и выше этих температур наблюдаются холодное и термическое денатурированные состояния. Форма кривой стабилизации и температуры переходов изменяются в присутствии осмолитов или адсорбентов [29].

Обращает на себя внимание, что по краям купола стабильность белка меньше, чем в середине. Это может быть связано с тем, что наряду со стабильным N-конформером в этом диапазоне температур присутствуют интермедиаты белка, которые по конформационной «гибкости» занимают промежуточное между N и D положение и тем самым метастабильны. Если концентрация интермедиатов достаточна и их объем отличен от объема N-конформера, это уменьшает термодинамическую устойчивость однофазной системы в

целом, поскольку может оказаться энергетически выгодным их выделение в отдельную фазу. Подобный случай нами теоретически рассматривался ранее [30]. Гомогенная однофазная система является термодинамически более устойчивой, чем система при наличии метастабильных состояний.

В случае существования одного стабильного конформера ΔG_N^D имеет форму одиночного купола, а ΔS_N^D монотонно растет в этом интервале температур и меняет знак при температуре максимальной стабилизации конформера. При наличии двух стабильных N- и N*-конформеров можно ожидать наличия двух выраженных экстремумов ΔG_N^D , обозначенных на рис. 1 как A и B соответственно, и двух кривых ΔS_N^D , пересекающихся $\Delta S_N^D = 0$ в точках экстремума при соответствующих температурах. Они сходятся вблизи температур ФП 1 рода $N \leftrightarrow D$ и $N^* \leftrightarrow D^*$, как это представлено на рис. 1. Здесь мы предполагаем, что состояния D и D*, N и N* различаются.

Энтропийные изменения белка. Из анализа рис. 1 можно выделить ряд энтропийных изменений, сопровождающих ФП белковых молекул в растворе в интервале температур от холодной до тепловой денатурации. Во-первых, это скачки энтропии для фазового перехода первого рода $D \leftrightarrow N$ и $N^* \leftrightarrow D^*$. Во-вторых, это изменения энтропии при переходах $D^* \leftrightarrow N$ и $D \leftrightarrow N^*$ через точки $\Delta S_N^D = 0$, а также при переходах NN^* . Эти изменения можно наглядно рассмотреть на примере гипотетической фазовой диаграммы в координатах «температура–энтропия», как показано на рис. 2. Здесь энтропийные изменения будут иметь соответствующие знаки:

$$\begin{aligned} \Delta S_N^D &= S^D - S^N < 0, \\ \Delta S_N^{D^*} &= S^{D^*} - S^{N^*} > 0, \\ \Delta S_N^{D^*} &= S^{D^*} - S^N > 0, \\ \Delta S_N^D &= S^D - S^{N^*} < 0. \end{aligned} \quad (1)$$

При построении фазовой диаграммы на рис. 2 исходили из того, что ФП первого рода обычно не заканчивается при одной температуре, но возможны метастабильные состояния. В нашем представлении подобные состояния могут возникнуть из-за интермедиатов белка I* и I. Относящиеся к ним изобары в форме кривых Ван-дер-Ваальса изображены на рис. 2. Метастабильные равновесия конформеров белка в интервале между T_1-T_3 и T_6-T_4 возможны, если эти конформеры будут находиться под разными давлениями. В критических точках [25] T_3 и T_4 различие между интермедиатами и нативными конформерами,

которое может быть обусловлено их разными объемами и давлениями, исчезает.

На рис. 2 также показаны фазовые переходы первого порядка при T_1 и T_6 и область постепенного превращения конформера N в конформер N* (и наоборот) в интервале температур T_3-T_4 как возможный фазовый переход более высокого порядка, чем первый.

Химические потенциалы конформеров белка. Поскольку на рис. 2 каждое метастабильное равновесие представлено своей изобарой, а давление и химический потенциал компонента взаимосвязаны ($\Delta\mu = P\Delta V$), возможные изменения различных конформеров белка от температуры в интервале температур от термической до холодной денатурации могут быть представлены в терминах химических потенциалов (рис. 3), а не давлений. Химический потенциал μ вещества уменьшается с ростом температуры при постоянном давлении, так как $(\partial\mu/\partial T)_p = -S$, а энтропия S положительна [31]. Качественно зависимости μ^i от T , где $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$ – соответствующие состояния белка, показаны на рис. 3. Их форма определена из общих теоретических представлений о температурном поведении химического потенциала компонент в конденсированной системе [31]. Помимо этого, подобные зависимости следуют из

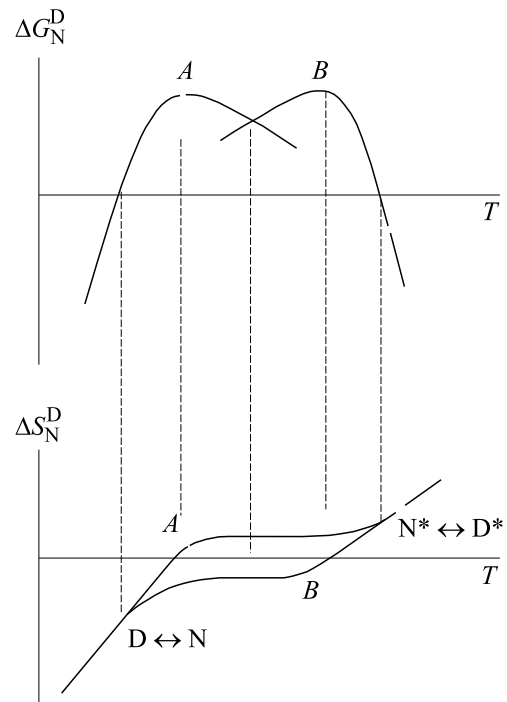


Рис. 1. Зависимость энергии Гиббса ΔG_N^D (а) и энтропии ΔS_N^D (б) разности D- и N-состояний белка, представленного двумя стабильными конформерами A и B в интервале температур от холодной до тепловой денатурации.

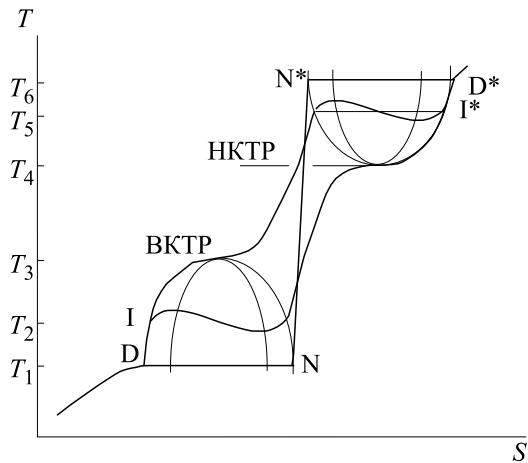


Рис. 2. Схематическое изображение фазовой диаграммы модельного белка со свойствами, представленными на рис. 1, в координатной плоскости «температура (T) – энтропия (S)». Горизонтальные линии между N и D , а также N^* и D^* , соответствуют фазовым переходам первого рода. Кривые (изобары), образованные петлями Ван-дер-Ваальса при низких и высоких температурах, указывают на метастабильное равновесие между интермедиатом I и молекулами N , а также I^* - и N^* -молекулами.

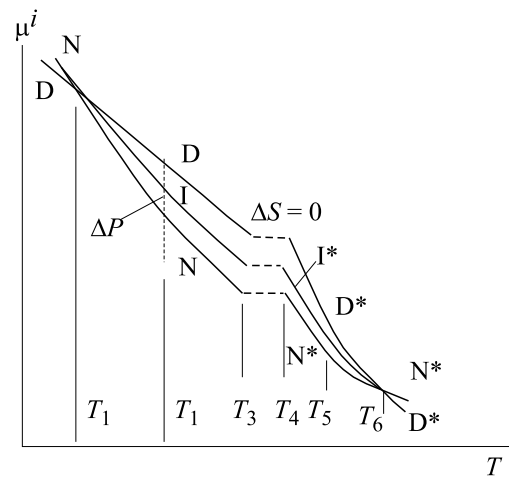


Рис. 3. Температурные зависимости химических потенциалов μ^i различных конформеров модельного белка ($i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$), построенные на основе общих термодинамических представлений о температурном поведении компонент в конденсированной системе [31]. T_1 и T_6 – фазовые переходы $N \leftrightarrow D$ и $N^* \leftrightarrow D^*$; T_2 и T_5 – средние температуры зоны метастабильных равновесий; T_3 и T_4 являются критическими точками с VKTP и HKTP соответственно. Между T_3 и T_4 находится сверхкритическая макроскопически однофазная область с пониженной стабильностью.

известной фазовой диаграммы эллиптического типа, связывающей давление, при котором происходят ФП $N \leftrightarrow D$, с температурой (диаграмма Хаулея (С. А. Hawley)), где вместо давления используется химический потенциал. Углы наклона касательных к кривым, характеризующим $S^D, S^N, S^{D^*}, S^{N^*}$, выбраны так, чтобы выполнялись условия (1). Поэтому углы наклона касательной к S^D меньше, чем к S^N , а углы наклона касательной к S^{D^*} больше, чем S^{N^*} . В данном диапазоне температур от T_1 до T_6 наиболее стабильны состояния белка N и N^* , поэтому значения μ^N и μ^{N^*} минимальны. При этом состояния D и D^* наименее стабильны, поэтому значения μ_D и μ_{D^*} максимальны. Соответственно концентрация белков изменяется в сторону N и N^* как более стабильных состояний, а содержание D^* - и D -форм становится незначительным. Можно предположить, что эти закономерности сохраняются, если вместо S^D и S^{D^*} рассматривать S^I и S^{I^*} , как показано на рис. 3.

Наличие метастабильного равновесия между макромолекулами N, I (или N, D), имеющих разный объем (или обладающими разными химическими потенциалами), будет обеспечиваться разными давлениями на них. Это возможно, если на уровне макромолекул действует закон Лапласа о капиллярном давлении. Сосуществование N, I (или N, D) макромолекул термодинамически эквивалентно появлению метастабильного зароды-

ша новой фазы в старой фазе. Есть формула (см. работу [25]), связывающая радиус метастабильного зародыша R с разницей давлений в нем P_2 с давлением в основной фазе P_1 или с разницей в химических потенциалах:

$$R = 2\sigma/(P_2 - P_1) \text{ или } R = 2\sigma v_2/(\mu_1 - \mu_2), \quad (2)$$

где σ – поверхностное натяжение, μ – химический потенциал частиц в фазах, v_2 – объем ядра.

Согласно этим выражениям разность $(P_2 - P_1)$ может быть такой, что зародыш новой фазы соизмерим с размером молекулы белка, однако чем разность меньше, тем радиус новой фазы будет больше. Различие между давлениями на N - и D -конформеры может быть значительным. Об этом говорят экспериментальные факты использования гидростатического давления для проверки адекватности эллиптической формы фазового равновесия $N \leftrightarrow D$ на фазовой диаграмме Хаулея [32] в координатах $\{P, T\}$. Поскольку объем нативного состояния больше, чем развернутого, то, согласно этой диаграмме, равновесие $N \leftrightarrow D$ при любой температуре из диапазона $T_1 - T_6$ можно достичь либо ростом гидростатического давления, которое ведет к уменьшению объема N -конформера до объема D -конформера, либо ростом отрицательного давления, которое увеличивает объем D -конформера до объема N -конформера. И в том и другом случае это большие значения давлений – в сотни МПа [33] (или десятки кбар).

Чем больше разница давлений, тем меньше значение R , которое будет приближаться к молекулярному. Можно предположить, что такого же порядка давления необходимы, чтобы интермедиаты находились в метастабильном равновесии $N \leftrightarrow I$. Может ли капиллярное давление обеспечить такую разность, неизвестно.

С другой стороны, можно достичь метастабильного равновесия при гораздо меньших значениях давления, если интермедиаты группируются в кластеры или микрофазы. В этом случае на них будет действовать давление Лапласа $\Delta P = \pm 2\sigma/R$, где ΔP – разность давлений в соседних фазах, разделенных искривленной поверхностью R . Недавно были получены интересные результаты в диапазоне гидростатических давлений до 1 кбар, когда на примере γ -кристаллина было показано, что фазовый переход L–L очень чувствителен к относительно низкому давлению [34]. Так, при низких температурах капли γ -кристаллина переходят в гомогенный раствор при давлении около 0.1 кбар, что находится в пределах капиллярного давления микронных капель. Поэтому гораздо более вероятно существование метастабильного равновесия в форме ФП L–L, чем в форме отдельных молекул. Такой подход позволяет перейти от термодинамики отдельных конформеров белка к термодинамике жидких фаз, состоящих из этих конформеров, и рассматривать их метастабильное равновесие как ФП типа «жидкость–жидкость».

При температурах T_1 и T_6 (ФП первого рода) на рис. 3 наблюдается излом потенциальных кривых, но в точке их пересечения обеспечивается равновесие всех состояний белка как по объему, так и по давлению. Между температурами T_3 и T_4 , где $\Delta S^D_N = 0$, предполагается существование зоны, в которой возможен непрерывный переход как переход более высокого порядка, чем ФП-1, от N-конформера к N*- и I*-конформерам, и от N*-конформера к N- и I-конформерам. Этот переход должен сопровождаться ростом флуктуаций концентраций конформеров. Зона между T_3 и T_4 интересна тем, что дисперсия белка здесь является термодинамически устойчивой, поскольку в ней нет фазовых границ и метастабильных состояний, как по краям всего температурного диапазона, но из-за развития флуктуаций такое состояние характеризуется пониженной термодинамической устойчивостью [25]. Вместе с тем эта зона оказывается зоной максимальной стабильности нативного состояния и она, согласно теории Семенченко [35], может обладать определенными термодинамическими преимуществами при функционировании белковых систем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Если $\Delta G^D_N = 0$ определяет границу перехода $N \leftrightarrow D$, то граница термодинамической устойчивости дисперсии белка по отношению к диффузионным процессам (концентрационные флуктуации перестают «растворяться», и это способствует фазообразованию) определяется детерминантом устойчивости $\delta^2 G = 0$, где $\delta^2 G = \det(\partial^2 G / \partial m_i / \partial m_j)$ [11]. Здесь m_i и m_j – молярные концентрации компонентов раствора: белка и осмолита соответственно. Равенство нулю этого детерминанта позволяет рассчитать границу устойчивости системы к разделению фаз (спинодаль) [11]. К спинодали примыкает бинадаль как линия метастабильного равновесия фаз. LLPTs есть общая критическая точка спинодали и бинадали и обычно наблюдается в непосредственной близости от кривой растворимости нативной формы белка [2, 3]. Такой подход позволяет перейти от рассмотрения проблемы конформации и ее стабильности для индивидуальной формы белка к проблеме устойчивости всей дисперсии по отношению к разделению на фазы и образованию метастабильных состояний из разных по стабильности и растворимости форм белка. Это можно сделать посредством фазовых диаграмм «температура–состав» (рис. 4), где состав определяется отношением m_2/m_3 [11]. Эта диаграмма представляет систему, в которой существуют два стабильных конформера N и N* и два интермедиата I и I* (рис. 4). В основе диаграммы лежит типичная диаграмма смешения системы полимер–растворитель [14], но концентрация соли выступает как параметр, играющий роль давления, поскольку кривые 1–6 – изобары.

На рис. 4 показаны две бинадали – одна с НКТР и одна с ВКТР (соответствующие им спинодали (внутренние параболы) и связанные с этим неравновесные процессы здесь рассматриваться не будут). Бинадали соответствуют метастабильным равновесиям типа $N \leftrightarrow I$ или $N^* \leftrightarrow I^*$, представленными на рис. 2, но в данном контексте не на молекулярном, а на фазовом уровне. Кривые растворимости белка представлены тонкими линиями. Цифры слева от 1 до 6 соответствуют возрастающим концентрациям электролита m_3 в дисперсии белка, в то время как по оси абсцисс меняется концентрация белка m_2 . Кривые растворимости, соединяющие противоположные стороны бинадали, отражают метастабильное равновесие конформеров $N \leftrightarrow I$ (кривые 1 и 2) и $N^* \leftrightarrow I^*$ (кривые 3 и 4). В этих случаях макрофазы дисперсии содержат молекулы N и N*, а микрофазы-кластеры содержат интермедиаты I и I*, соответственно. Кривые 5 и 6 соответствуют равновесию фазы из I*-конформеров и их аморфных агрегатов.

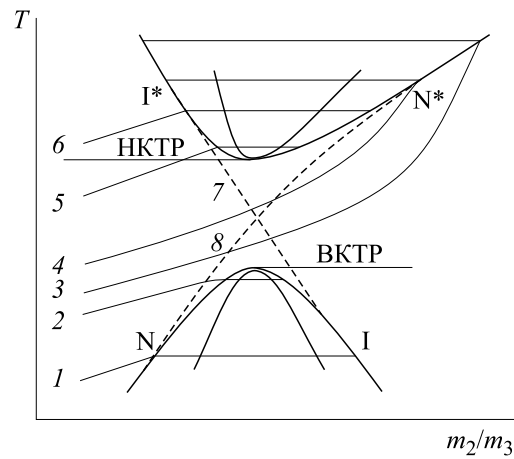


Рис. 4. Гипотетическая фазовая диаграмма дисперсии модельного белка в плоскости «температура (T) — состав (m_2/m_3)», где m_2 — концентрация белка, m_3 — концентрация соли. Бинодали и спинодали представлены низкотемпературными и высокотемпературными параболой с НКТР и ВКТР. $N \leftrightarrow I$ и $N^* \leftrightarrow I^*$ — метастабильные равновесия соответствующих конформеров белка и состоящих из них фаз. 1–6 — Кривые растворимости белка при возрастании концентрации соли, отражающие общий эффект «всаливания» и «высаливания»; 7 — растворимость олигомеров белка; 8 — растворимость микрофибрилл.

Согласно рис. 4 I -кластеры должны быть более плотные, чем N -фаза (эквивалент «капель» в газовой фазе), а I^* -кластеры — менее плотные, чем N^* -фаза (эквивалент «пузырей» в жидкой фазе). Это теоретически возможно, если I^* -конформеры формируют вытянутые криволинейные или линейные фибриллы. Статистическая трактовка подобного явления, предложенная Онзагером для вытянутых макромолекул полимеров, допускает в таком случае фазовое разделение (цитируется по [36]). Вследствие деплеционного механизма микрофибриллы из I^* -конформеров будут создавать отдельные микрофазы, внутри которых будет действовать потенциал отталкивания из-за перекрытия вытянутых «сфер влияния» с формированием «пустого» пространства, куда другие фибриллы стерически попадать не могут.

Поскольку как в низкотемпературных, так и в высокотемпературных кластерах могут идти процессы полимеризации, то могут возникать олигомеры белка в первом случае (пунктирная линия 7), либо фибриллы белка во втором (пунктирная линия 8). Их растворимости также будут зависеть от температуры и концентрации соли, и эти предполагаемые изменения показаны пунктирными линиями 7 и 8 на рис. 4.

В критических точках (НКТР и ВКТР) различие между конформерами N и I или N^* и I^* исчезает. Точка пересечения штриховых линий приходится на область закритических фазовых переходов, в которой существует флуктуационная смесь всех конформеров и их возможных ассоци-

атов. Эта область макроскопически однофазна, хотя имеет пониженную термодинамическую устойчивость из-за флуктуаций. Здесь сильно развиты флуктуации концентрации различных конформеров, вероятно, в виде динамических мезоскопических кластеров [3]. Вместе с тем в этой области нативное состояние белка является наиболее стабильным, потому что в этом состоянии ему соответствует максимальное число макромолекул.

Нами было показано ранее [30, 37], что образование зародышей — кластеров латентной фазы в белковой дисперсии может быть энергетически выгодным, если полярные и заряженные группы одной белковой молекулы располагаются вблизи неполярных групп другой молекулы белка при формировании ядер. Это связано с компенсацией вклада неполярных групп в уменьшение энтропии при упорядочении воды. Таким образом, неполярная область одной молекулы белка как бы экранируется другой молекулой белка от взаимодействия с объемной водой, при этом удаление молекул воды из зоны контакта не происходит. Поэтому образование таких белковых кластеров не меняет отношения поверхности к объему. Так в кластерах регулируется гидрофобность интерфейса за счет модификации структуры воды между поверхностями макромолекул. Чем меньше экранируемая за счет взаимодействия поверхность (т.е. разность $(\mu_1 - \mu_2)$ в уравнении (2)), тем больше молекул должно объединиться в кластер-микрофазу и тем больше должен быть ее размер, чтобы получить энергетический выигрыш. Очевидно, более выгодно группироваться в кластер

таким молекулам, у которых экспонировано больше гидрофобных групп (в соответствии с уравнением (2) значение R должно быть меньше). Расчеты с учетом этих предположений показывают, что в недонасыщенных белковых растворах в объеме макрофазы могут возникать белковые кластеры переменного размера. Увеличение насыщенности приводит к уменьшению радиуса одних из них и увеличению радиуса других. Они становятся одинаковыми только при насыщении, когда достигается размер зародыша кристаллической фазы.

Поскольку в метастабильном равновесии микрофаз и основной фазы должны участвовать поверхностные силы, возникает необходимость учета капиллярного давления в белковых микрофазах, которое может быть как положительным, так и отрицательным. Практически отсутствует теоретическое описание этих явлений для белковых дисперсий [38]. Однако приближенные оценки по уравнению Лапласа для микрофаз размером до сотен нанометров показывают, что дополнительное давление в таких каплях может достигать десятков бар с учетом того, что удельная поверхностная энергия гидратной оболочки белка находится в пределах 15–30 мДж/м² [39].

Химические потенциалы молекул в дисперсии, находящейся в метастабильном равновесии, равны

$$\mu^{N,N^*}(P) = \mu^{I,I^*}(P \pm \Delta P),$$

где μ^{I,I^*} – химический потенциал молекул внутри кластера, а μ^{N,N^*} – в основной фазе. Экспериментальные данные показывают, что в низкотемпературном диапазоне I-фаза является более плотной, чем N-фаза. Это эквивалентно жидким «каплям», находящимся в равновесии с «газовой» фазой. Они стабилизированы избыточным давлением Лапласа на выпуклой поверхности «капель». В таких плотных «каплях» могут идти процессы, ведущие к олигомеризации белков (двухстадийное зародышеобразование здесь не рассматривается). Затем при повышении температуры выше зоны бинодали «растворение» плотной I-фазы может привести к появлению в дисперсии сферических олигомеров, растворимость и конформация которых в дальнейшем изменяются в направлении $I \rightarrow I^*$, как показано на рис. 4, и накоплению агрегатов фибриллярного типа.

Экспериментально установлено [40], что в высокотемпературном диапазоне в солевых дисперсиях белка в определенных условиях образуются агрегаты фибриллярного типа. Может оказаться, что I^* -конформеры участвуют в этом процессе. Появление таких асимметричных вытянутых ассоциатов значительно увеличивает их эффективный объем по сравнению с реальным объемом молекул, из которых они составлены. Часто ока-

зывается энтропийно выгодно выделение таких ассоциатов в отдельные фазы вследствие существования сегрегационного механизма неустойчивости. Если это так, то линейные ассоциаты I^* -конформеров могут создавать микрофазы, но менее плотные, чем фазы, составленные из доминирующих при этих температурах N^* -конформеров. Это подобно тому, как пузырьки возникают в жидкой фазе и существуют за счет избыточного давления Лапласа в системе с вогнутой поверхностью с отрицательной кривизной. Такие микрофазы из I^* -ассоциатов могут появляться в более плотной N^* -фазе за счет сил отталкивания. При этом силы отталкивания между надмолекулярными структурами в «сферах» вызывают дополнительное давление на основную фазу N^* -белка и обеспечивают стабильность фазового разделения типа L-L. Это может быть сопряжено с ростом положительных значений второго вириального коэффициента осмотического давления.

Предлагаемый подход не означает, что для любого белка реализуются все теоретически возможные состояния на фазовой диаграмме, так как каждый из белков имеет свою структуру, предысторию и особую среду функционирования. Тем не менее некоторые из них экспериментально зарегистрированы для ряда глобулярных белков.

Поскольку свернутые, развернутые и интермедиатные конформации белков различаются по своей гидратации и объему, поверхностное натяжение может играть важную роль в белок-белковых взаимодействиях, осмотическом давлении, образовании надмолекулярных структур и плотности их упаковки. Мы полагаем, что предложенные фазовые диаграммы белковой дисперсии, которые включают НКТР, ВКТР и сверхкритическую область между ними в отношении конкретных фазовых состояний дисперсии, также могут прояснить роль поверхностных эффектов в отношении плотности и полиморфизма кристаллических зародышей. Однако эффект поверхностного натяжения в малых микрофазах или белковых кластерах при достаточно высоких концентрациях требует гораздо более глубокого понимания, как и вероятные структуры жидкокристаллического типа внутри кластеров. Наиболее интересным аспектом является сверхкритическая зона фазовой диаграммы между ВКТР и НКТР, в которой существуют и трансформируются белковые мономеры, олигомеры и мезоскопические белковые кластеры. Несмотря на то, что эта макроскопически однородная фаза обладает пониженной термодинамической устойчивостью, нативная конформация белка в этой фазе оказывается наи-

более стабильна. Процессы в этой зоне могут представлять собой модель физико-химического состояния белков в клеточной протоплазме, которую следует рассматривать в связи с аналогичным состоянием межклеточной жидкости, так как вместе они могут контролировать осмотический гомеостаз как немедленный адаптивный ответ на колебания температуры или состава системы в условиях физиологического стресса [41].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено по Государственному заказу (проект № FMEN-2022-0006).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. В. Финкельштейн и А. Б. Птицын, *Физика белка: курс лекций* (Книжный дом «Университет», М., 2002).
2. V. N. Uversky and A. V. Finkelstein, *Biomolecules*, **9**, 842 (2019).
3. P. G. Vekilov, *J. Physics: Condensed Matter*, **24**, 193101 (2012).
4. A. V. Fonin, A. L. Darling, I. M. Kuznetsova, et al., *Cell Molec. Life Sci.*, **75**, 3907 (2018).
5. E. L. Baba, T. J. Kim, D. B. Rogers, et al., *J. Phys. Chem. B*, **120**, 12040 (2016).
6. A. A. M. André and E. Spruijt, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5908 (2020).
7. A. A. Nyman, C. A. Weber, and F. Julicher, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 39 (2014).
8. П. Хиппель и Т. Шлейх, в кн. *Структура и стабильность биологических макромолекул* (М.: Мир, 1973), Гл. 4.
9. J. J. Grigsby, H. W. Blanch, and J. M. Prausnitz, *Biophys. Chem.*, **91**, 231 (2001).
10. O. Galkin and P. G. Vekilov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6277 (2000).
11. S. P. Rozhkov and A. S. Goryunov, *Biophys. Chem.*, **151**, 22 (2010).
12. D. Bulone, V. Martorana, and P. L. San Biagio, *Biophys. Chem.*, **91**, 61 (2001).
13. С. П. Рожков, Актуальные вопросы биологической физики и химии, **6** (2), 330 (2021).
14. А. А. Тагер, *Физико-химия полимеров* (Научный мир, М., 2007).
15. G. L. Dignon, W. Zheng, Y. C. Kim, and J. Mittal, *ACS Cent. Sci.*, **5**, 821 (2019).
16. Y. Wang and O. Annunziata, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 1222 (2006).
17. O. Matsarskaia, M. K. Braun, F. Roosen-Runge, et al., *J. Phys. Chem. B*, **120**, 7731 (2016).
18. M. Adrover, G. Martorell, S. R. Martin, et al., *J. Mol. Biol.*, **417**, 413 (2012).
19. H. N. Hollowell, S. S. Younvanich, S. L. McNevin, et al., *J. Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 205 (2007).
20. B. M. Britt, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **37**, 394 (2004).
21. R. L. Tuinstra, F. C. Peterson, S. Kutlesa, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5057 (2008).
22. L. Bian, D. Wu, and W. Hu, *Biomed. Chromatogr.*, **28**, 295 (2014).
23. С. П. Рожков и А. И. Кяйвяряйнен, *Биофизика*, **30**, 772 (1986).
24. С. П. Рожков, А. С. Горюнов и М. Ю. Крупнова, *Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология*, № 11, 38 (2020).
25. И. П. Базаров, *Термодинамика* (Высшая школа, М., 1983).
26. M. Tsytlonok and L. S. Itzhaki, *Arch. Biochem. Biophys.*, **531**, 14 (2013).
27. C. Royer and R. Winter, *Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.*, **16**, 568 (2011).
28. П. Л. Привалов, *Биофизика*, **32**, 742 (1987)
29. C. Alfano, D. Sanfelice, S. R. Martin, et al., *Nature Commun.* **8**, 15428 (2017).
30. С. П. Рожков, *Биофизика*, **46**, 53 (2001).
31. П. Эткинс, *Физическая химия* (Мир, М., 1980).
32. S. A. Hawley, *Biochemistry*, **10**, 2436 (1971).
33. L. Smeller, F. Meersman, and K. Heremans, *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 497 (2006).
34. S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, and R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 7347 (2019).
35. В. К. Семенченко, *Журн. физ. химии*, **36** (1), 15 (1962).
36. Д. А. Фридрихсберг, *Курс коллоидной химии* (Химия, Л., 1984).
37. S. P. Rozhkov, *J. Cryst. Growth*, **273**, 266 (2004).
38. A. Cacciuto and D. Frenkel, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 6587 (2005).
39. С. П. Рожков и А. С. Горюнов, *Биофизика*, **51**, 236 (2006).
40. J. Juarez, S. G. Lope, and A. Cambon, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 10521 (2009).
41. С. П. Рожков, *Биофизика*, **50**, 115 (2005).

Possible Phase Effects in Dispersion of a Globular Protein in the Temperature Range of the Protein's Native State

S.P. Rozhkov* and A.S. Goryunov*

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

This work proposes a qualitative approach to study the mechanism of occurrence of phase transitions (PT) and equilibria of various types in globular protein dispersions in the temperature range within which the structure of a protein can be considered as the native state of a protein. Presumably, the presence of two types of N and N* native conformers with a maximum stability in different temperature ranges is possible, but for these protein conformations, structural phase transition is reversible. It is also expected that there are two types of protein intermediates, I and I*, coexisting with N and N* conformers in the corresponding temperature ranges. Possible ways of transfer from the thermodynamics of (pre)denaturation protein transitions to the thermodynamics of condensation phase transitions of the overall dispersion, with the formation of phase boundaries, are discussed. I and I* intermediates are assumed to be involved in liquid–liquid (L–L) phase transitions, forming microphases (clusters) out of them in metastable equilibrium with the solution phase composed of native conformers. The onset of phase transitions depends both on the microenvironment of protein macromolecules in the dispersion and on the properties of protein intermediates. Phase diagrams plotted in temperature and entropy (T - S) coordinates, in the $\mu^I - T$ plane, illustrate zones of metastable states $N \leftrightarrow I$ and $N^* \leftrightarrow I^*$, the upper and lower critical solution temperatures have been determined and the zone of supercritical phase transitions are shown. The conditions under which $N \leftrightarrow I$ and $N^* \leftrightarrow I^*$ metastable equilibria are phase transitions of the (L-L) type are discussed. It is concluded that maximal protein stability is achieved just in the region of critical phase transitions. This region is homogeneous, but on the whole, it is characterized as a zone of reduced thermodynamic stability of protein dispersion.

Keywords: chemical potential, conformation, intermediates, clusters, phase transitions, phase diagram