

## ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПОЛИМОРФ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА, ИНДУЦИРУЕМЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С ИОНАМИ СОЛЕЙ, В ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДАХ ТИПА ЖИДКОСТЬ-ЖИДКОСТЬ

Рожков С.П.

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 185910, РФ; e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

**Аннотация.** Рассматриваются фазовые переходы типа жидкость-жидкость (L-L) в водно-солевых дисперсиях глобулярных белков в нативных состояниях ( $N^*$ ,  $N$ ) в интервале температур между тепловой ( $D^*$ ) и холодной ( $D$ ) денатурацией. Предполагается, что белковые интермедиаты ( $I$ ,  $I^*$ ), возникающие в результате неравновесной (де)сорбции ионов в процессе переходов  $D \leftrightarrow N$  и  $D^* \leftrightarrow N^*$ , участвуют в фазовом переходе L-L с образованием кластеров и фибрилл в основной фазе белков  $N$  и  $N^*$ . Таким образом они компенсируют свой избыточный химический потенциал ( $ChPot$ ), обусловленный несбалансированным распределением адсорбированных ионов соли в структуре белка по сравнению с  $N$ -белком. Температурная модель поведения  $ChPots$  ( $\Delta\mu_i$ ) различных состояний белка: низкотемпературного  $i = D, N, I$  и высокотемпературного  $i = D^*, N^*, I^*$ , переходы между ними, а также температурная зависимость  $ChPot$  растворителя ( $\Delta\mu_1$ ) представлены в форме фазовых диаграмм. На этой основе обсуждаются взаимосвязь между значениями  $\Delta\mu_1$  и температурами L-L-переходов (верхней и нижней критическими температурами растворения), а также причины неидеального поведения осмотического давления в водно-солевых белковых дисперсиях.

**Ключевые слова:** фуллерен  $C_{60}$ , кофеин, водный раствор, агрегация.

Вопросы равновесия и фазовых переходов (ФП) первого рода между нативным ( $N$ ) и денатурированным ( $D$ ) состояниями белка остаются предметом интенсивных исследований в связи с проблемами самоорганизации белка [1]. В то же время ФП типа жидкость-жидкость (L-L) в дисперсиях глобулярных белков, которые обычно наблюдаются в диапазоне стабилизации нативной формы белка, также привлекают большое внимание. Они связаны с образованием белковых кластеров (микрофаз) в определенных температурных диапазонах, близких к ФП первого рода как со стороны низких ( $D \leftrightarrow N$ ) переходы так и высоких ( $D^* \leftrightarrow N^*$  переходы) температур. Роль кластерной организации в биосистемах имеет громадное значение. Она сопряжена с явлениями многоступенчатой кристаллизации и агрегации белков [2,3], определяет гетерофазную организацию безмембранных органелл в цитоплазме и нуклеоплазме [4,5], участвует в регуляции осмотического гомеостаза и мгновенных адаптационных реакциях на уровне макромолекул [6,7], связана с развитием конденсационных заболеваний [8,9], технологиями пищевой индустрии [10]. Вместе с тем возможная взаимосвязь явлений белкового фолдинга и L-L переходов в дисперсиях белков исследована явно недостаточно.

Одной из нерешенных проблем является соотношение кластерной организации дисперсии глобулярного белка в области L-L переходов и конформационного состояния молекул в кластере [11,12]. Обычно неизменными участниками L-L переходов в цитоплазме [13-16] являются белки с внутренне неупорядоченной структурой. Вследствие этого представляется весьма вероятным, что пути и механизмы тепловых  $D^* \leftrightarrow N^*$  и холодных  $D \leftrightarrow N$  переходов могут предопределять существование L-L переходов в дисперсиях глобулярных белков [17]. ФП типа L-L с критической точкой (при критическом составе и температуре) изучены к настоящему времени на относительно простых белковых модельных системах вода - глобулярный белок [11,12] и вода-белок-соль [18]. Экспериментально исследованы зависимости температуры критических точек L-L переходов от концентрации белков, различных солей [19] или других осмолитов, находящихся в дисперсии [20]. Для системы вода-белок-соль было получено условие для критического состава, которому должна соответствовать критическая температура [18]:

$$\frac{m_2}{m_3} = \frac{2 + 2 \left[ 1 + \nu^2 z^{-2} (2 + \Delta)^2 \right]^{1/2}}{\nu(2 + \Delta)}. \quad (1)$$

Здесь  $m_2/m_3$  – отношение молярных концентраций белка и соли, соответственно,  $z$  – заряд белка,  $\nu$  – количество ионов электролита, сорбируемых белком,  $\Delta$  – функция коэффициента активности соли. При этом  $m_2/m_3$  характеризует критический состав системы, при котором происходит критический фазовый переход между фазой, представленной молекулярным раствором белка, и кластерной организацией раствора белка.

Плотные кластеры содержат около тысячи молекул белка и возникают в области температур L-L переходов под действием сил коллоидного взаимодействия: короткодействующего потенциала притяжения и дальнедействующего потенциала отталкивания. Кластеры-олигомеры размером 2-10 молекул имеют динамическую природу и постоянно возникают в растворах белков. Их число пропорционально концентрации белка. Кластеры третьего типа имеют мезоскопические размеры в сотни нанометров [11]. Изучение механизма образования таких кластеров находится лишь в начальной стадии [21] и может быть связано с существованием закритического состояния белковых растворов [22].

По имеющимся данным растворимость части глобулярных белков (сывороточный альбумин [23], серповидноклеточный гемоглобин [24],  $\alpha$ -эластин [25]) снижается с повышением температуры, а их растворы имеют нижнюю критическую температуру растворимости (НКТР). Другая группа белков (лизоцим, кристаллины [26], иммуноглобулины [27]) лучше растворяются при повышении температуры и их растворы имеют верхнюю критическую температуру растворимости (ВКТР). Часто в дисперсиях белков наблюдается кристаллический полиморфизм, который связывают с наличием кластеров. Например, лизоцим имеет шесть кристаллических модификаций, причем некоторые из них отличаются количеством молекул воды на аминокислоту [28]. При этом обнаружено влияние связывания и гидратации ионов на кристаллическую решетку [29]. Известно, что белки могут иметь несколько десятков центров связывания различных анионов и катионов с разным аффинитетом [30-32]. В свою очередь, способность ионов к связыванию и их гидратация сильно зависят от температуры. Это влияет на их расположение в лиотропном ряду и селективность связывания [33-35]. Поскольку растворимость различных полиморф является функцией температуры, значений pH и концентрации солей [36], то иногда она следует температурному тренду от нормального к ретроградному, или наоборот [37]. Существуют экспериментальные данные [38] и теоретические представления [17,39,40], согласно которым один и тот же белок способен образовать дисперсию как с ВКТР, так и с НКТР в зависимости от его микроокружения, определяющегося составом и значениями pH раствора (заряд белка), концентрацией и типом электролита, осмолитов и др. В своем рассмотрении мы исходим из потенциальной возможности существования ВКТР и НКТР в дисперсии одного и того же белка, хотя и разного состава, что находит свое отражение в предлагаемых фазовых диаграммах.

Считается, что наличие в белках участков с внутренне неупорядоченной структурой способствует образованию интермедиатов [33]. При этом потенциал связывания белков с ионами поливалентных металлов является важным фактором индуцированных металлом конформационных изменений белка, приводящих к появлению частично свернутых интермедиатов. Даже низкие концентрации некоторых металлов могут непосредственно вызывать образование фибрилл. В свою очередь, наличие специфических центров связывания ионов и температурные зависимости их эффективности определяются аминокислотной последовательностью [41]. Варьируя концентрации различных солей или pH растворов глобулярного белка, можно менять зарядовое состояние белка и влиять на его внутреннюю неупорядоченность. Таким образом, возникает возможность регулировать число и состояние интермедиатов и влиять на расположение L-L переходов на фазовой диаграмме. Поэтому в качестве термодинамической основы L-L переходов мы будем рассматривать наличие ряда интермедиатов I и I\* белка,  $D \leftrightarrow N$  и  $D^* \leftrightarrow N^*$  переход у которых в силу ряда причин сдвинут в сторону более высоких либо более низких температур по сравнению с основным пулом белка.

Когда основная масса белка переходит в N конформацию в процессе  $D \leftrightarrow N$  фазового превращения, фракции интермедиатов I остаются в промежуточной конформации между D и N. Если N-белки и I-белки будут иметь разный удельный объем, обусловленный наличием разного количества "пустот" в их структуре, химический потенциал молекул меньшего объема I будет больше, чем более крупных N. В таких случаях нарушается равновесие, которое может быть скомпенсировано выделением молекул с большим потенциалом в отдельную фазу (своего рода эффект изотермической перегонки). В качестве новой фазы могут возникать микроскопические белковые кластеры, содержащие интермедиаты. Капиллярное давление в таких кластерах может способствовать выравниванию химических потенциалов молекул в фазе интермедиатов по отношению к молекулам в основной фазе и установлению их метастабильного равновесия. Если по мере удаления от температуры  $D \leftrightarrow N$  переходов структурно-динамические различия между интермедиатами и молекулами в основном состоянии будут уменьшаться, то возникнут условия для критического фазового перехода и формирования термодинамически устойчивой по отношению к процессам диффузии однофазной системы, в которой N состояние молекул будет максимально стабильным.

Таким образом, основной задачей работы является разработка феноменологического подхода, который позволил бы представить на одной фазовой диаграмме холододые  $N \leftrightarrow D$  и тепловые  $N^* \leftrightarrow D^*$  равновесные фазовые переходы первого рода. Кроме того, рассматривается их продолжение в область L-L переходов как метастабильных равновесий между фазой молекул белка, находящихся в основной конформации (N или N\*), и фазой интермедиатов (I или I\*) белка, находящихся в составе кластеров. При этом низкотемпературные и высокотемпературные состояния D и D\*; N и N\*; I и I\* хотя и близки структурно, но термодинамически различаются. Эти метастабильные равновесия как со стороны низких, так и высоких температур будут заканчиваться в критических точках при определенной температуре и соответствующем составе (НКТР и ВКТР) водно-солевой белковой дисперсии образованием устойчивой макроскопически однофазной системы.

Для решения задачи мы рассматриваем гипотетическую фазовую диаграмму температурных изменений химических потенциалов различных состояний белка  $\mu^i$ , где  $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$ . Для того, чтобы установить взаимосвязь состояний молекул белков с состоянием системы вода-белок-соль, в качестве интегрального параметра мы используем химический потенциал растворителя  $\Delta\mu_1$  и его температурные изменения, которые зависят от состояний белка. Этот параметр также отражает поведение осмотического давления дисперсии и с его помощью может быть учтен вклад в эффективное осмотическое давление различных конформационных состояний молекул.

## МОДЕЛЬ

Известно, что с повышением температуры при постоянном давлении химический потенциал вещества  $\mu$  понижается, так как  $(\partial\mu/\partial T)_p = -S$ , а энтропия  $S$  положительна [42]. При этом, чем ниже потенциал, тем более стабильна система. Используем это для представления поведения химических потенциалов различных состояний белка  $\mu^i$ , где  $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$  - соответствующие состояния белка. На рисунке 1 представлена такая качественная диаграмма, на которой  $N$  и  $N^*$ -состояния белка наиболее стабильны ( $\mu^N$  и  $\mu^{N^*}$  меньше) в диапазоне температур между  $T_1$  (фазовый переход  $N \leftrightarrow D$ ) и  $T_6$  (фазовый переход  $N^* \leftrightarrow D^*$ ), а  $D$  и  $D^*$  состояния наименее стабильны ( $\mu^D$  и  $\mu^{D^*}$  больше) в этом диапазоне. В сторону более стабильного состояния изменяется и концентрация белков и содержание  $D^*$  и  $D$  формы становится ничтожным. Потенциалы интермедиатов белка  $I$  и  $I^*$  при этом принимают промежуточные значения, равно как и их концентрации. При температурах  $T_1$  и  $T_6$  температурные зависимости потенциалов имеют место излом, но их равенство обеспечивает равновесие всех состояний белка.

Можно предположить, что при дальнейшем повышении температуры химические потенциалы различных состояний белков могут изменяться нелинейно, так что в интервале  $T_2$ - $T_5$  различие между потенциалами  $N$ - $I$  и  $N^*$ - $I^*$  состояний наиболее значительно (рисунок 1), а состояние – неравновесно. Это и определяет возможность ФП типа  $L$ - $L$ , при котором молекулы с большим потенциалом группируются в кластер. Однако, начиная с температуры  $T_5$ , которая близка к температуре критического фазового перехода, значения  $\mu^N$  и  $\mu^I$  могут выравниваться и причины для  $L$ - $L$  перехода исчезают, поскольку все молекулы становятся энергетически и структурно неразличимы. Аналогичные рассуждения справедливы для конформеров  $N^*$  и  $I^*$  в диапазоне температур ниже тепловой денатурации ( $T < T_6$ , рисунок 1). Здесь неразличимость  $N^*$  и  $I^*$  наступает при  $T < T_4$ . Если в температурном промежутке между  $T_3$  и  $T_4$  переход между конформерами белка происходит в точках, образующих горизонтальную линию с общей касательной, то это соответствует непрерывному фазовому переходу [42]. При этом интермедиат  $I$  может переходить в стабильный конформер  $N^*$ , а интермедиат  $I^*$  - в стабильный конформер  $N$ .

Этот вывод согласуется с экспериментальными данными. Так, в диапазоне температур 12-20 °С сывороточный альбумин в растворе представлен единственным нативным конформером А, в то время как в диапазоне температур 22-50 °С белок представлен двумя нативными конформерами А и В, причем доля конформера В растет с температурой [43]. При 58 °С и выше происходит спонтанное превращение А в В. Для растворов ряда ферментов также было показано [44], что имеют место два нативных конформера белка с разными температурами их стабилизации. Была выдвинута гипотеза, что такое конформационное устройство характерно для всех ферментов. При этом высокотемпературный конформер может находиться в состоянии расплавленной глобулы. С помощью методики Ферстеровского переноса энергии (smFRET) было показано [45], что наряду с  $N$ -состоянием уже при комнатных температурах, практически сразу после  $N \leftrightarrow D$  перехода появляется большая доля молекул со структурой, близкой к высокотемпературному  $D$ -состоянию.

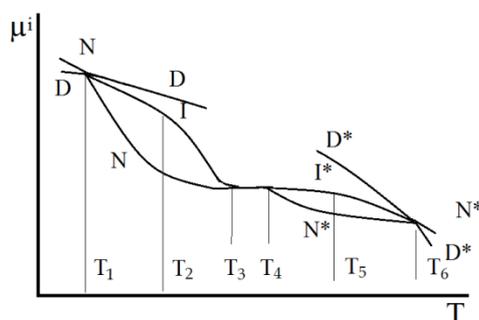
Если рассматривать систему вода-белок-соль в целом, при каждой температуре для нее справедливо уравнение Гиббса-Дюгема:

$$d\mu_1 = -(n_N/n_1)d\mu^N - (n_I/n_1)d\mu^I - (n_D/n_1)d\mu^D. \quad (2)$$

Здесь  $\mu_1$  – химический потенциал водно-солевого растворителя. При этом последним слагаемым из-за малости  $n_p$  можно пренебречь. Отношения  $n_N/n_1$  и  $n_I/n_1$  характеризуют число молей воды, связанной с макромолекулами в одном состоянии и не связанной в другом. Поэтому  $n_I/n_1 \approx (1 - n_N/n_1)$ . Выберем в качестве стандартного состояния денатурированного белка  $\mu^D$ . Тогда (2) примет вид:

$$d\Delta\mu_1 \approx -(n_N/n_1)d(\mu^N - \mu^D) - (n_I/n_1)d(\mu^I - \mu^D). \quad (3)$$

С учетом того, что  $d\mu^i = (\partial\mu^i/\partial T)dT = -S^i$ , ур. 3 примет вид:



**Рисунок 1.** Гипотетическое температурные зависимости химических потенциалов  $\mu^i$  различных конформеров белка ( $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$ ) в интервале от  $T_1$  (фазовый переход  $N \leftrightarrow D$ ) до  $T_6$  (фазовый переход  $N^* \leftrightarrow D^*$ );  $T_2$  и  $T_5$  – температуры образования кластеров;  $T_3$  и  $T_4$  – критические фазовые переходы между фазами нативного белка и фазами интермедиатов с верхней и нижней критическими температурами растворения, соответственно.  $T_3$  -  $T_4$  – за критическая макроскопически однофазная область

$$\Delta\mu_1 \approx (n_N / n_1)(S^N - S^I)\Delta T - (1/n_1)(S^D - S^I)\Delta T. \quad (4)$$

Аналогичное уравнение справедливо и для  $S^{N^*}$ ,  $S^{I^*}$ ,  $S^{D^*}$ . Таким образом, температурное поведение химического потенциала воды будет определяться разностью энтропий различных состояний белка при соответствующей температуре, или углом наклона кривых  $\mu^i$  (рисунок 1). С учетом того, как это представлено на данном рисунке, в диапазоне температур ( $T_1 - T_2$ ):  $S^N > S^I > S^D$ . В диапазоне температур ( $T_2 - T_3$ ):  $S^N < S^I$  и  $S^N \approx S^D$ . В интервале ( $T_3 - T_4$ )  $S^N = S^I = 0$ . В интервале ( $T_4 - T_5$ )  $S^{N^*} > S^{I^*}$  и  $S^{N^*} \approx S^{D^*}$ . В интервале ( $T_5 - T_6$ )  $S^{N^*} < S^{I^*} < S^{D^*}$ . С учетом этого ур. 4 позволяет предсказать существенно нелинейное поведение  $\Delta\mu_1$  между  $T_1$  и  $T_6$ . Так, в диапазоне низких температур  $\Delta\mu_1$  сначала растет и достигает максимума при  $T_2$ , а затем убывает (полуволна 1). Соответственно, в диапазоне высоких температур  $\Delta\mu_1$  сначала убывает при понижении температуры от  $T_5$  до  $T_6$ , а затем возрастает (полуволна 2). В области температур  $T_3 - T_4$  эти две "полуволны" сходятся.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что водно- белковые системы способны к реентрантным (возвратным) фазовым переходам при изменении температуры (холодовая D и тепловая  $D^*$  денатурация)  $D \leftrightarrow N \leftrightarrow D^*$ , концентрации поливалентного электролита [46,47] и гидростатического давления [48]. Физико-химические системы с реентрантными переходами обычно описываются эллиптической диаграммой Тамманна [49]. Ранее такая диаграмма была адаптирована для анализа  $D \leftrightarrow N$  переходов белковых систем в модели двух состояний в координатах давление P - температура T [50]. Результат интегрирования уравнения  $d\Delta G = -\Delta SdT + \Delta VdP$  от референтной точки с координатами  $T_0, P_0$  до T, P дает кривую второго порядка [51]. Условие равновесия  $\Delta G = 0$  определяет границу фазового равновесия  $D \leftrightarrow N$ , которая располагается на периметре скошенного эллипса.

По аналогии с этим для систем при постоянном давлении, но с переменным количеством вещества (например, вследствие эффектов предпочтительной гидратации), с учетом изменения химического потенциала растворителя  $\Delta\mu_1$ , уравнение для дифференциала свободной энергии будет иметь вид [52]:

$$d\Delta G = -\Delta SdT - \Delta n_1 d\mu_1, \quad (5)$$

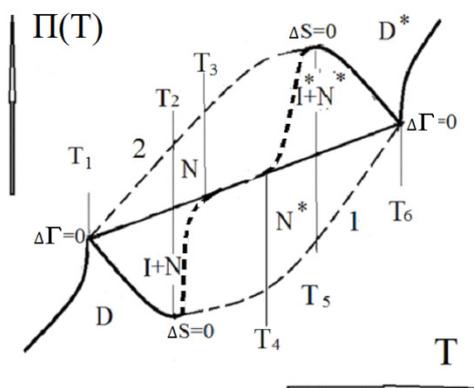
где  $\Delta n_1$  – коэффициент предпочтительного связывания. Интегрирование (5) также дает полином второго порядка относительно переменных T,  $\Delta\mu_1$  и в условиях равновесия  $\Delta G = 0$  представляет собой эллипс в координатах T- $T_0, \mu_1 - \mu_0 = \Delta\mu_1$  [52].

Как известно,  $\Delta\mu_1 = (\mu_1 - \mu_0)$  определяет сродство между компонентами раствора:  $\Delta\mu_1 = RT \ln a_1$ . При этом  $\Delta\mu_1 = -V_1\Pi$ . Осмотическое давление  $\Pi$  раствора белка:

$$\Pi \approx RTc_2(1/M_2 + B_2c_2), \quad (6)$$

где  $c_2, M_2, B_2$  – концентрация белка, молекулярная масса и второй вириальный коэффициент, зависит от механизмов взаимодействия между компонентами раствора и взаимодействиям белков с ионами электролита [53], что определяется величиной и знаком коэффициента  $B_2$ . Таким образом, с формальной точки зрения фазовые диаграммы в координатах изменения гидростатического и осмотического давления от температуры должны быть схожими [54].

На рисунке 2 представлена схематическая фазовая диаграмма в координатах  $\Pi - T$  ( $\Pi = -\Delta\mu_1/V_1$ ) в форме, близкой к эллиптической. Сначала  $\Pi$  в области холодной денатурации белка растет с температурой до точки ФП 1го рода ( $T_1$ ), связанной с появлением нативного состояния. С приближением к этой точке  $(\partial\Delta\mu_1/\partial T) \rightarrow \infty$ , поскольку в точке перехода функция  $\Delta H = T\Delta S = -T((\partial\Delta\mu_1/\partial T)) \neq 0$  терпит разрыв. То же и для области высоких температур. На рисунке 2 температуры  $T_1$  и  $T_6$  также соответствуют  $N \leftrightarrow D$  и  $N^* \leftrightarrow D^*$  фазовым переходам. Если



**Рисунок 2.** Гипотетическая фазовая диаграмма дисперсии глобулярного белка в координатах осмотическое давление  $\Pi$  – температура T. Крайние точки "эллипса" соединены "нейтральными" линиями  $\Delta S = S^D - S^N = 0$  и  $\Delta V = V^D - V^N = 0$ . D и  $D^*$  - денатурированные состояния, N и  $N^*$  - нативные состояния. I и  $I^*$  – интермедиаты белка. I+N,  $I^*+N^*$  – метастабильные состояния, возникающие в результате фазовых переходов жидкость-жидкость. Знак (\*) означает, что тепловые и холодные формы белка могут быть неидентичными

бы N, D и I молекулы имели одинаковый молярный объем, их осмотическое давление изменялось бы вдоль "нейтральной" линии  $\Delta V = V^D - V^N = 0 = V^I - V^N$ . Однако обычно  $V^N > V^D$  [55]. Это неравенство может сохраняться и для интермедиатов белка, для которых фазовый переход  $N \leftrightarrow D$  не закончился. Поскольку их химический потенциал повышен, они находятся в нестабильном состоянии при температурах выше фазового перехода. Однако с образованием кластера, в котором капиллярное давление уравновесит избыточный химический потенциал, они могут переходить в метастабильное состояние. Появление плотных кластеров белка аналогично тому, что в системе доминирует потенциал притяжения.

Таким образом, эллиптическая форма диаграммы предполагает существование в интервале  $T_1 - T_6$  фракций белка с молекулами разного объема (D, D\*, N, N\*, I, I\*). Две «полуволны», представленные на рисунке 2 жирными линиями, обусловлены нелинейным поведением  $\Delta\mu_1$  (ур. 3) и вписываются в эллипс. При этом в точках экстремумов осмотического давления  $\partial(\Delta\mu_1)/\partial T = -(S^D - S^N) = 0$ , что соответствует положению «нейтральной» линии  $\Delta S = S^D - S^N = 0$ . При температуре  $T_3$  исчезают условия для фазового разделения, поскольку N-состояние молекул белка и состояние интермедиатов белка I становятся энергетически и объемно неразличимы. Это критический переход, который является предельным случаем ФП I-go рода. Ему также соответствует условие существования "нейтральных" линий  $\Delta S = S^I - S^N = 0$  и  $\Delta V = V^I - V^N = 0$ .

Фазовый переход  $D^* \leftrightarrow N^*$  в области высоких температур также сопровождается образованием интермедиатов, однако в силу особенностей гидратации и взаимодействия с ионами солей создаются условия для формирования агрегатов линейных и/или криволинейных фибрилл как кластеров новой фазы. Так, было показано, что сывороточный альбумин [56] и лизоцим [57] при уменьшении pH и в присутствии солей при комнатных и повышенных температурах способны образовывать фибриллы, кинетические условия для формирования которых и их структура существенно зависят от микроокружения. Для таких анизотропных вытянутых образований суммарный потенциал взаимодействия может становиться потенциалом отталкивания, и подобные микрофазы должны быть менее плотными, чем основная фаза. При температуре  $T_4$  исчезают условия для фазового разделения, поскольку N\*-состояние молекул белка и состояние интермедиатов белка становятся энергетически и объемно неразличимы. Это критический переход как предельный случай ФП I-go рода. Этому соответствует  $\Delta S = S^{N^*} - S^{I^*} = 0$  и  $\Delta V = V^{N^*} - V^{I^*} = 0$ .

Замыкают эллипс пунктирные линии 1 и 2. Они могут соответствовать вкладу в изменение  $\Pi$  олигомеров белка (1), возникающих при дестабилизации плотных кластеров, либо криволинейных фибрилл (2), возникающих при дестабилизации ансамблей линейных фибрилл.

Известно, что осмотическое давление ведет себя существенно неидеально в зависимости от потенциала притяжения между молекулами, молекулами и водой, а также взаимодействия белков с ионами солей [58-60]. При этом оно должно уменьшаться, следуя соответствующей траектории на фазовой диаграмме в области нижней петли на рисунке 2 в интервале  $T_1 - T_2$ , в связи с образованием плотных кластеров. С ростом концентраций солей знак 2 вириального коэффициента становится отрицательным, и это сопряжено с образованием кластеров. При этом наблюдаются малые значения осмотического давления и давления набухания (если образуется белковый гель [61]). В кластерах белка в условиях повышенной плотности молекул могут идти как процессы зародышеобразования, так и образования олигомеров белка. В диапазоне нейтральных значений pH около 20% белка могут находиться в составе олигомеров [62]. Эти олигомеры частично сохраняются по завершении L-L фазового перехода и дают свой вклад в осмотическое давление (пунктир (1) между  $T_2$  и  $T_6$  на рисунке 2). По мере роста температуры олигомеры могут дестабилизироваться и давление возрастать.

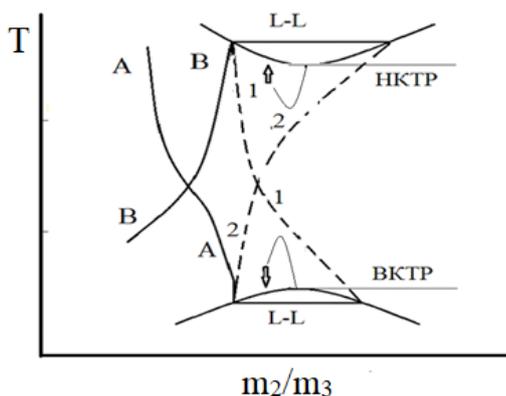
В диапазоне высоких температур механизм взаимодействия изменяется. Наиболее вероятно, что ионы солей по-разному взаимодействуют с молекулами белка при низких и высоких температурах. Установлено, что при пониженных температурах на белке адсорбируются предпочтительно анионы (особенно для 1:1 электролита), даже несмотря на отрицательный заряд белка [60]. В этом видится аналогия с повышением pH раствора [62]. При больших температурах сродство катионов с белком может увеличиваться (особенно поливалентных), что обусловлено особенностями гидратации и энтропийными эффектами. В этом видится аналогия с понижением pH раствора [62]. При этом возможна перезарядка поверхности с (-) на (+), которая при сильной адсорбции катионов может приводить к электростатическому отталкиванию молекул и реэнтрантому фазовому переходу [23,46]. Эксперименты по осмотическому давлению показывают, что денатурация белка приводит к разным типам его динамического поведения и взаимодействия при пониженных и повышенных pH [63]. В первом случае усиливается сегментальная подвижность белка, способствующая образованию филаментов, а во втором случае меньшая подвижность способствует образованию интермедиатов белка и олигомеризации. Если в области высоких температур между  $T_6$  и  $T_5$  возникают кластеры, содержащие вытянутые белковые фибриллы как результат L-L фазового перехода, то в этом случае вириальный коэффициент может принимать большие положительные значения [53] (петля между  $T_6$  и  $T_4$  на рисунке 2). По мере уменьшения температуры ниже НКТР остаются небольшие криволинейные фибриллы (пунктирная линия 2 на рисунке 2), которые разрушаются при дальнейшем уменьшении температуры. Вблизи области холодной денатурации остаются мономеры [64], которые вносят свой вклад в осмотическое давление.

Таким образом, в диапазоне нативных состояний белка между  $T_1$  и  $T_6$  общее осмотическое давление и его отклонение от идеальности будет определяться вкладом от всех возможных конформационных состояний молекул белка, включающих кластеры интермедиатов, олигомеры, различные фибриллы и агрегаты. На рисунке 2 этот возможный суммарный вклад может быть представлен совокупностью линий, ограниченной условным эллипсом.

Диаграмма на рисунке 2 допускает существование реэнтрантных фазовых переходов при изменении концентрации и типа соли в результате их влияния на смещение температур  $T_2$  и  $T_5$  и изменения наклона линии  $\Delta S = S^D - S^I = 0$ . Сначала рост концентрации соли (ионной силы) ведет к уменьшению температурного диапазона между  $T_2$  и  $T_5$ , но дальнейший рост приводит к его расширению. При постоянной же температуре улучшение качества растворителя переводит систему из области геля [64] с малым давлением набухания (вне эллипса), через дисперсию белка (внутри эллипса), в область геля с большим давлением набухания (вне эллипса).

На основе рисунка 2 можно предложить расширенную фазовую диаграмму дисперсии белка в координатах температура - состав (рисунок 3). При этом состав определяется отношением молярных концентраций белка и соли  $m_2/m_3$  согласно уравнению (1). Диаграмма учитывает наличие двух L-L ФП [38], возможное существование двух А и В конформационных состояний нативного белка в диапазоне температур нативного состояния [43] (при этом одно из них может быть интермедиатом в соответствующем температурном интервале), наличие большой фракции белковых олигомеров [62] и упорядоченных агрегатов амилоидоподобных фибрилл [57]. На рисунке 3 пунктирными линиями представлены кривые растворимости олигомеров белка и криволинейных фибрилл. Те и другие могут существовать в промежутке между ВКТР и НКТР как возможный результат дестабилизации белковых кластеров и линейных фибрилл, возникающих при L-L фазовых переходах. На положение ВКТР и НКТР на температурной шкале существенное влияние оказывают соли и/или водорастворимые полимеры [38]. На основе существующих данных можно предположить, что с ростом концентрации солей [19] и полимеров НКТР и ВКТР сначала сближаются по температуре, затем, в зависимости от ионной силы, начинают расходиться, создавая условия для реэнтрантных (возвратных) фазовых переходов [23]. Таким образом, реализация гипотетической ФД (рисунок 3) предполагает наличие изменяющегося состава дисперсии по концентрации как белка, так и других осомолитов, в то время как при постоянном составе то или иное конформационное и фазовое изменение может и не наблюдаться в заданном диапазоне температур.

В области промежуточных температур линии растворимости конформеров А и В могут пересекаться, что отражает тот факт, что при повышении температуры химический потенциал конформера В становится меньше, чем у конформера А, который все больше превращается в В форму. При пониженных температурах – наоборот, химический потенциал А конформера становится ниже, и он преобладает в растворе белка. Слева от этих линий конформеры образуют истинный раствор, тогда как справа от них находится область состояний, в которой наблюдается образование соответствующих конденсационных состояний в растворе белка. Так, в области повышенных температур справа от кривой А могут возникать фибриллы белка путем одноступенчатой конденсации, в то время как на линии бинодали в этой области олигомеры белка и В-конформеры белка образуют конденсационные структуры в результате ФП L-L, в которых также возможно образование как фибрилл из олигомеров (двухступенчатое фибриллообразование), так и аморфных агрегатов-сферулитов [65]. В результате дестабилизации конденсационных образований, возникающих при ФП L-L в этой области температур, справа от линии бинодали возможно образование метастабильного состояния, представленного криволинейными фибриллами. Такие структуры были обнаружены в растворах лизоцима [57]. Их растворимость понижается с понижением температуры (кривая 2 на рисунке 3), в то время как растворимость олигомеров повышается (кривая 1) при понижении температуры.



**Рисунок 3.** Гипотетическая фазовая диаграмма глобулярного белка в водно-солевых растворах в координатах температура – состав  $m_2/m_3$ , где  $m_2$  и  $m_3$  – молярные концентрации белка и соли, соответственно. А и В – возможные конформеры нативного белка [43]. При этом состояния как А, так и В-конформер могут быть близки к расплавленной глобуле в соответствующем температурном интервале. Переходы жидкость-жидкость в области бинодалей (горизонтальные линии) соответствуют системам с нижней и верхней критическими температурами растворения (НКТР и ВКТР). Пунктирные кривые – линии растворимости олигомеров белка (1) и криволинейных фибрилл (2) в закритической области между НКТР и ВКТР. Кривые со стрелками показывают возможные изменения температур критических точек с ростом концентрации солей  $m_3$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фазовая диаграмма эллиптического типа в координатах давление-температура  $\{P, T\}$  давно и успешно используется для выяснения термодинамических особенностей кооперативных переходов в белковых молекулах. Диаграмма такого типа распространяется и на координаты осмотического давления от температуры  $\{P, T\}$  при постоянном внешнем давлении. Анализ поведения химических потенциалов нативного и денатурированного состояния молекул белка, а также их интермедиатов, показал, что диаграмма  $\{P, T\}$  способна отражать не только ФП первого рода  $N \leftrightarrow D$ , но и ФП типа  $L-L$ , а также критические ФП с НКТР и ВКТР, происходящие при соответствующих температуре и водно-солевом составе. Эта диаграмма позволяет учесть наличие в дисперсии белка олигомеров, аморфных и фибриллярных агрегатов, гелеобразных состояний, которые формируют существенно неидеальное поведение осмотического давления в диапазоне температур между холодовой и тепловой денатурацией. Кроме того, диаграмма учитывает наличие в дисперсии белка реэнтрантных фазовых переходов, зависящих от температуры, концентрации солей и/или других осмолитов. Все это открывает возможности для анализа и прогнозирования конформационных, структурных и возвратных фазовых переходов на основе одной и той же координатной плоскости.

**Список литературы / References:**

1. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка*. М.: Университет, 2002, 376 с. [Finkelstein A.V., Ptitsyn A.V. *Protein Physics*, Boston e.a.: Academic Press, 1st ed., 2002, 354 p. (In Russ.)]
2. Sleutel M., van Driessche A.E.S. Role of clusters in nonclassical nucleation and growth of protein crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2014, vol. 111, no.5, pp. E546-E553. doi: 10.1073/pnas.1309320111
3. Golub N., Meremyanin A., Markossian K., Eronina T., Chebotareva N., Asryants R., Mironets V., Kurganov B. Evidence for the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation. *FEBS Lett.*, 2007, vol. 581, no. 22, pp. 4223-4227. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.066
4. Shin Y., Brangwynne C.P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, 2017, vol. 357, no. 6357, p. eaaf4382. doi: 10.1126/science.aaf4382
5. Yewdall N.A., Mason A.T., van Hest J.C.M. The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells. *Interface Focus*, 2018, vol. 8, no. 5, p. 20180023. doi: 10.1098/rsfs.2018.0023
6. Rozhkov S.P. Three-component system water-biopolymer-ions as a model of molecular mechanisms of osmotic homeostasis. *Biophysics*, 2001, vol. 46, no. 1, pp. 51-57.
7. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Phase states of water-protein(polypeptide)-salt system and reaction to external environment factors. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 1, pp. 43-48. doi: 10.1134/S0006350914010175
8. Fandrich M., Schmidt M., Grigorieff N. Recent progress in understanding Alzheimer's b-amyloid structures. *Trends Biochem. Sci.*, 2011, vol. 36, no. 6, pp. 338-345. doi: 10.1016/j.tibs.2011.02.002
9. Sivalingam V., Prasanna N.L., Sharma N., Prasad A., Patel B.K. Wild-type hen egg white lysozyme aggregation in vitro can form self-seeding amyloid conformational variants. *Biophys. Chem.*, 2016, vol. 219, pp. 28-37. doi: 10.1016/j.bpc.2016.09.009
10. Nicolai T., Durand D. Controlled food protein aggregation for new functionality. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2013, vol. 18, no. 4, pp. 249-256. doi: 10.1016/j.cocis.2013.03.001
11. Vekilov P.G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions. *J. Phys: Condens. Matter*, 2012, vol. 24, no. 19, p. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101
12. Dumetz A.C., Chockla A.M., Kaler E.W., Lenhoff A.M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid-liquid phase separation, gels, and aggregates. *Biophys. J.*, 2008, vol. 94, no. 2, pp. 570-583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152
13. Uversky V.N. Under-Folded Proteins: Conformational Ensembles and Their Roles in Protein Folding, Function, and Pathogenesis. *Biopolymers*, 2013, vol. 99, no. 11, pp. 870-887. DOI: 10.1002/bip.22298
14. El-Baba T.J., Kim D., Rogers D.B., Khan F.A., Hedes D.A., Russell D.H., Clemmer D.E. Long lived intermediates in a cooperative two-state folding transitions. *J.Phys.Chem.B*, 2016, vol. 120, no. 47, pp. 12040-12046. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b08932
15. Feig M., Sugita Y. Reaching new levels of realism in modeling biological macromolecules in cellular environments. *J. Mol. Graph. Model.*, 2013, vol. 45, pp. 144-156. doi: 10.1016/j.jm gm.2013.08.017
16. Hyman A.A., Weber C.A., Julicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2014, vol. 30, pp. 39-58. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013325
17. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Stable, metastable, and supercritical phases in solutions of globular proteins between upper and lower denaturation temperatures. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 4, pp. 539-546. doi: 10.1134/S0006350917040182
18. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Thermodynamic study of protein phases formation and clustering in model water-protein-salt solutions. *Biophysic. Chem.*, 2010, vol. 151, pp. 22-28. doi: 10.1016/j.bpc.2010.04.007
19. Grigsby J.J., Blanch H.W., Prausnitz J.M. Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions: effect of salt type, salt concentration and pH. *Biophys.Chem.*, 2001, vol. 91, pp. 231. doi: 10.1016/s0301-4622(01)00173-9
20. Galkin O., Vekilov P.G. Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid-liquid phase boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, vol. 97, no. 12, pp. 6277-6281. doi: 10.1073/pnas.110000497

21. Vekilov P.G., Vorontsova M.A. Nucleation precursors in protein crystallization. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, 2014, vol. 70, no. 3, pp. 271-282. doi: 10.1107/S2053230X14002386
22. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions. *J. Supercrit. Fluid.*, 2014, vol. 95, pp. 68-74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028
23. Matsarskaia O., Braun M.K., Roosen-Runge F., Wolf M., Zhang F., Roth R., Schreiber F. Cation-Induced Hydration Effects Cause Lower Critical Solution Temperature Behavior in Protein Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 2016, vol. 120, no. 31, pp. 7731-7736. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b04506
24. Han J., Herzfeld J. Interpretation of the osmotic behavior of sickle cell hemoglobin solutions: different interactions among monomers and polymers. *Biopolymers*, 1998, vol. 45, no. 4, pp. 299-306. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(19980405)45:4<299::AID-BIP4>3.0.CO;2-G
25. Kaibara K., Watanabe T., Miyakawa K. Characterization of critical processes in liquid- liquid phase separation of the elastomeric protein- water system: microscopic observations and light scattering measurements. *Biopolymers*, 2000, vol. 53, no. 5, pp. 369-379. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(20000415)53:5<369::AID-BIP2>3.0.CO;2-5
26. Lomakin A., Asherie N., Benedek G.B. Aeolotropic interactions of globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, vol. 96, no. 17, pp. 9465-9458. doi: 10.1073/pnas.96.17.9465
27. Luo H., Leeb N., Wang X., Li Y., Schmelzer A., Hunter A.K., Pabst T., Wang W.K. Liquid-liquid phase separation causes high turbidity and pressure during low pH elution process in Protein A chromatography. *J. Chromatogr., A*, 2017, vol. 1488, p. 57-67. doi: 10.1016/j.chroma.2017.01.067
28. Yaminsky I.V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I., Rashkovich L.N. Atomic Force Microscopy Study of Lysozyme Crystallization. *Crystallography Reports*, 2002, vol. 47, suppl. 1, pp. S149-S158.
29. Gillespie C.M., Asthagiri D., Lenhoff A.M. Polymorphic protein crystal growth: influence of hydration and ions in glucose isomerase. *Cryst. Growth Des.*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 46-57. doi: 10.1021/cg401063b
30. Von Hippel P.H., Schleich T. The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In: Timasheff, S.N. Fasman, G.D., Eds. *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, N.Y.: Marcel-Dekker, 1969, pp. 417-574.
31. Record T.M., Anderson C.F., Lohman T.M. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening and ion effects on water activity. *Quart. Rev. Biophys.*, 1978, vol. 11, no. 2, pp. 103-178. doi: 10.1017/s003358350000202x
32. Collins K.D. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. *Biophys. Chem.*, 2006, vol. 119, no. 3, pp. 271-281. doi: 10.1016/j.bpc.2005.08.010
33. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human synuclein. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 47, pp. 44284-44296. doi: 10.1074/jbc.M105343200
34. Senske M., Constantinescu-Aruxandei D., Havenith M., Herrmann C., Weingartner H., Ebbinghaus S. The temperature dependence of the Hofmeister series: thermodynamic fingerprints of cosolute-protein interactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, vol. 18, no. 43, pp. 29698-29708. doi: 10.1039/c6cp05080h
35. Dudev T., Lim C. Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins. *Chem. Rev.*, 2014, vol. 114, no. 1, pp. 538-556. doi: 10.1021/cr4004665
36. Aldabaibeh N., Jones M.J., Myerson A.S., Ulrich J. The solubility of orthorhombic lysozyme crystals obtained at high pH. *Cryst. Growth Des.*, 2009, vol. 9, no. 7, pp. 3313-3317. doi: 10.1021/cg900113e
37. Veessler S., Ferte N., Costes M.-S., Czjzek M., Astier J-P. Temperature and ph effect on the polymorphism of aprotinin (BPTI) in sodium bromide solutions. *Cryst. Growth Des.*, 2004, vol. 4, no. 6, pp. 1137-1141. doi: 10.1021/cg0498195
38. Wang Y., Annunziata O. Comparison between protein-polyethylene glycol (PEG) interactions and the effect of PEG on protein-protein interactions using the liquid-liquid phase transition. *J. Phys. Chem. B.*, 2006, vol. 111, no. 5, pp. 1222-1230. doi: 10.1021/jp065608u
39. Cin ar H., Fetahaj Z., Cinar S., Vernon R.M., Chan H.S., Winter R.H.A. Temperature, hydrostatic pressure, and osmolyte effects on liquid-liquid phase separation in protein condensates: physical chemistry and biological implications. *Chem. Eur. J.*, 2019, vol. 25, pp. 13049-13069. doi: 10.1002/chem.201902210
40. Shiryayev A., Pagan D.L., Gunton J.D., Rhen D.S., Saxena A., Lookman T. Role of solvent for globular proteins in solution. *J. Chem. Phys.*, 2005. vol. 122, no. 23, p. 234911. doi: 10.1063/1.1931655
41. Ma L., Cui Q. Temperature dependence of salt-protein association is sequence specific. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 48, pp. 14466-14472. doi:10.1021/bi0613067
42. Atkins P.W. *Physical Chemistry*, Oxford, Melbourne, Tokyo: Oxford University Press, 1998, 997 p.
43. Bian L., Wu D., Hu W. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, 2014, vol. 28, no. 2, pp. 295-301. doi: 10.1002/bmc.3020
44. Hollowell H.N., Younvanich S.S., McNevin S.L., Britt B.M. Thermodynamic analysis of the low- to physiological-temperature nondenaturational conformational change of bovine carbonic anhydrase. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2007, vol. 40, no. 2, pp. 205-211. DOI: 10.5483/bmbrep.2007.40.2.205
45. Aznauryan M., Nettels D., Holla A., Hofmann H., Schuler B. Single-molecule spectroscopy of cold denaturation and the temperature-induced collapse of unfolded proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, vol. 135, no. 38, pp. 14040-14043. doi: 10.1021/ja407009w

46. Matsarskaia O., Roosen-Runge F., Lotze G., Moeller J., Mariani A., Zhang F., Schreiber F. Tuning phase transitions of aqueous protein solutions by multivalent cations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, vol. 20, no. 42, pp. 27214-27225. doi: 10.1039/c8cp05884a
47. Zhang F., Weggler S., Ziller M.J., Ianeselli L., Heck B.S., Hildebrandt A., Kohlbacher O., Skoda M.W.A., Jacobs R.M.J., Schreiber F. Universality of protein reentrant condensation in solution induced by multivalent metal ions. *Proteins*, 2010, vol. 78, no. 16, pp. 3450-3457. doi: 10.1002/prot.22852
48. Luong T.Q., Kapoor S., Winter R. Pressure - A gateway to fundamental insights into protein solvation, dynamics, and function. *ChemPhysChem*, 2015, vol. 16, no. 17, pp. 3555-3571. doi: 10.1002/cphc.201500669
49. Johari G.P. The Tammann phase boundary, exothermic disordering and the entropy contribution change on phase transformation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, vol. 3, pp. 2483-2487. doi: 10.1039/b100246p
50. Hawley S.A. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 1971, vol. 10, no. 13, pp. 2436-2442. doi: 10.1021/bi00789a002
51. Smeller L. Pressure temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1595, no. 1-2, pp. 11-29. doi: 10.1016/S0167-4838(01)00332-6
52. Scharnagl C., Reif M., Friedrich J. Stability of proteins: Temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, vol. 1749, no. 2, pp. 187-213. doi: 10.1016/j.bbapap
53. Edsall J.T. The size, shape and hydration of of protein molecules. In: Neurath H., Bailey K., Eds. *The proteins*, vol. 1, part B. NY: Academic Press inc., 1953, pp. 549-726.
54. Kornblatt J.A., Kornblatt M.J. The effects of osmotic and hydrostatic pressures on macromolecular systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1595, no. 1-2, pp. 30-47. doi: 10.1016/s0167-4838(01)00333-8
55. Royer C., Winter R. Protein hydration and volumetric properties. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2011, vol. 16, no. 6, pp. 568-571. doi: 10.1016/j.cocis.2011.04.008
56. Juarez J., Lopez S.G., Cambon A., Taboada P., Mosquera V. Influence of electrostatic interactions on the fibrillation process of human serum albumin. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, no. 30, pp. 10521-10529. doi: 10.1021/jp902224d
57. Miti T., Mulaj M., Schmidt J.D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. *Biomacromolecules*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 326-335. doi:10.1021/bm501521r
58. Rescic J., Vlachy V., Jamnik A., Glatter O. Osmotic pressure, small-angle X-ray, and dynamic light scattering studies of human serum albumin in aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, vol. 239, no. 1, pp. 49-57. doi: 10.1006/jcis.2001.7545
59. McBride D.W., Rodgers V.G.J. Interpretation of negative second virial coefficients from non-attractive protein solution osmotic pressure data: an alternate perspective. *Biophys. Chem.*, 2013, vol. 184, pp. 79-86. doi: 10.1016/j.bpc.2013.09.005
60. Medda L., Monduzzi M., Salis A. The molecular motion of bovine serum albumin under physiological conditions is ion specific. *Chem. Commun. (Camb.)*, 2015, vol. 51, no. 30, pp. 6663-6666. doi: 10.1039/c5cc01538c.
61. Navarra G., Giacomazza D., Leone M., Librizzi F., Militello V., San Biagio P.L. Thermal aggregation and ion-induced cold-gelation of bovine serum albumin. *Eur. Biophys. J.*, 2009, vol. 38, no. 4, pp. 437-446. doi: 10.1007/s00249-008-0389-6
62. Fullerton G.D., Kanal K.M., Cameron I.L. Osmotically unresponsive water fraction on proteins: non-ideal osmotic pressure of bovine serum albumin as a function of pH and salt concentration. *Cell Biol. Int.*, 2006, vol. 30, no. 1, pp. 86-92. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.11.001
63. Arabi S.H., Aghelnejad B., Schwieger C., Meister A., Kerth A., Hinderberger D. Serum albumin hydrogels in broad pH and temperature ranges: characterization of their self-assembled structures and nanoscopic and macroscopic properties. *Biomater. Sci.*, 2018, vol. 6, no. 3, pp. 478-492. doi: 10.1039/c7bm00820a
64. Ikenoue T., Lee Y.-H., Kardos J., Saiki M., Yagi H., Kawata Y., Goto Y. Cold denaturation of  $\alpha$ -synuclein amyloid fibrils. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, vol. 53, no. 30, pp. 7799-7804. doi: 10.1002/anie.201403815
65. Adachi M., So M., Sakurai K., Kardos J., Goto Y. Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation. *J. Biol. Chem.*, 2015, vol. 290, no. 29, pp. 18134-18145. doi: 10.1074/jbc.M115.648139

**POSSIBLE ROLE OF GLOBULAR PROTEIN POLYMORPHS INDUCED BY INTERACTION WITH SALT IONS IN LIQUID-LIQUID TYPE PHASE TRANSITIONS****Rozhkov S.P.**

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences  
Pushkinskaya str., 11, Petrozavodsk, 186910, Russia; e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

**Abstract.** Liquid-liquid (L-L) type phase transitions in water-salt dispersions of native ( $N^*$ ,  $N$ ) globular proteins in the temperature range between thermal ( $D^*$ ) and cold ( $D$ ) denaturation have been considered. Protein intermediates ( $I$ ,  $I^*$ ) arising as a result of the ion non-equilibrium (de)sorption in the process of  $D \leftrightarrow N$  and  $D^* \leftrightarrow N^*$  transitions are assumed to be involved in the L-L phase transition forming clusters and fibrils in the main phase of  $N$  and  $N^*$  proteins. Thus, they compensate for their excess chemical potential (ChPot) caused by unbalanced distribution of adsorbed salt ions in protein structure as compared to  $N$  protein. A temperature model for the behavior of ChPots ( $\Delta\mu^i$ ) of various states of the protein (low-temperature  $i = D, N, I$  and high-temperature  $i = D^*, N^*, I^*$ , transitions between them), as well as the temperature dependence of the solvent ChPot ( $\Delta\mu_1$ ) are presented in the form of phase diagrams. The relationship between the values of  $\Delta\mu_1$  and the temperatures of L-L transitions (upper and lower critical solution temperatures) as well as the reasons for the nonideal behavior of osmotic pressure in water-salt protein dispersions are discussed on this basis.

**Key words:** *protein intermediates, clusters, liquid-liquid phase transitions, phase diagram, osmotic pressure.*