

СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОКАЛОРИМЕТРИЯ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ – НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ И ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ

©2018 г.

С. А. ПОТЕХИН

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Фосфолипиды. III. Переход клубок – глобула модельных полимеров под воздействием температуры. IV. Белки. V. Сопоставление результатов, полученных на объектах различной природы. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Создание новых методов исследования является основой развития технологий получения новых знаний. Обычно информационному прорыву в той или иной области науки предшествует разработка нового метода или подхода, обеспечивающего возможность получения такой информации, которая ранее была недоступна или её получение было крайне затруднено.

С точки зрения термодинамики интерес к воздействию высокого давления на молекулярные объекты ничуть не меньше, чем воздействие температурой. Однако если каждый год в мировой литературе печатаются тысячи (если не десятки тысяч) статей с результатами изучения воздействия температуры на различные объекты, статей по воздействию давления как минимум на порядок меньше. Этот факт является отражением отсутствия высокочувствительных серийных приборов для подобных исследований. Быстрое увеличение количества статей, использующих высокое давление, выполненных на несерийных лабораторных установках, отражает растущий интерес к тем возможностям, которые открывают это направление науки. Результаты подобных исследований могут оказаться крайне полезными как при изучении фундаментальных вопросов молеку-

лярной биологии и биофизики, так и в прикладном плане для самых различных нужд биотехнологии [1–5].

Во-первых, известно, что изучение влияния давления на конформационные переходы макромолекул позволяет оценивать денатурационные и активационные объемы, что достаточно трудно сделать при постоянном давлении. Измерение этих параметров для различных объектов позволит набрать определенную статистику, проследить наличие корреляций между структурой макромолекулы и изменением ее парциального объема в результате перехода. Это, в свою очередь, может стать основой для создания полуэмпирической теории, связывающей структурные параметры макромолекулы с денатурационными и/или активационными объемами.

Во-вторых, возможности биотехнологических применений использования сверхвысоких давлений очень широки. В частности, высокие давления могут быть использованы при промышленном производстве ферментов (лекарственные препараты и промышленные ферменты). Уже сейчас известно, что основная проблема при получении рекомбинантных белков, полученных путем экспрессии того или иного гена в бактериях, сводится к ренатурации получаемых белков, часто накапливающихся в неактивной форме в виде «тел включения» [6]. С другой стороны, кинетические исследования ренатурации показывают, что основной проблемой при выборе условий ренатурации является агрегация промежуточных, частично свернутых форм белка [7–11]. Высокое давление заметно подавляет агрегацию [12, 13], что позволяет надеяться на существенно более высокий выход активного продукта в ходе ренатурации при высоких давлениях.

В-третьих, существует определенный интерес к применению высокого давления и в пищевой технологии [14, 15]. Он обусловлен тем обстоятельством, что белки могут денатурировать под действием высокого давления даже при комнатных температурах. С другой стороны, денатурация белка является ключевым моментом в большинстве процессов пищевой технологии. Денатурация пищевых белков, входящих в состав сырья, приводит к формированию структуры продукта, определяющего его привлекательность для потребителя. Вместе с тем денатурация белков патогенных микроорганизмов, присутствующих в сырье, обеспечивает стерилизацию, а, следовательно, безвредность и длительность хранения пищевого продукта [16]. В традиционной пищевой технологии денатурация белков осуществляется в результате нагревания до высоких температурах (выше 100°C). При этом наряду с денатурацией идут нежела-

тельные процессы распада или химической модификации многих важных составляющих, в частности, витаминов, ароматообразующих веществ, аминокислот, липидов и углеводов. Поэтому возможность снижения температуры денатурации за счет повышения давления представляется особенно интересной. Таким путем, например, можно получать пищевые продукты длительного хранения, состав которых в наибольшей степени соответствует физиологическим потребностям человека.

Еще один принципиально важный вопрос – это выяснение особенностей, касающихся принципов самоорганизации и поддержания структуры макромолекул из живых организмов, обитающих на больших глубинах при очень больших давлениях (до 1000 атм). Это же относится к белкам из супертермофилов. Как недавно показано [17, 18], в отличие от большинства белков из других источников давление способно оказывать на них стабилизирующее влияние.

В связи с вышеизложенным ясно, что подробное и систематическое изучение термодинамической стабильности макромолекул при высоком давлении, а также природы изменения объема при конформационных переходах является необходимым этапом широкого внедрения высокого давления в научные исследования, биотехнологию и пищевую технологию. На нарастающий интерес к изучению влияния высокого давления на самые разные биологически важные макромолекулы и живые организмы указывает существенный рост статей, посвященных этим вопросам.

Изменение объема в результате того или иного процесса – важный термодинамический параметр, позволяющий судить о том, какое воздействие будет оказывать повышение давления на этот процесс. Однако наука о природе объемных изменений при конформационных изменениях макромолекул развита крайне слабо. С другой стороны, знание зависимости энтальпии любого конформационного перехода от температуры и давления могло бы позволить рассчитать объемные изменения при переходе, а также скачки коэффициентов изобарического расширения и изотермического сжатия.

В 2007–2009 гг. в Институте белка РАН совместно с Институтом физики высоких давлений им. Л.Ф. Верещагина РАН был разработан и изготовлен уникальный сканирующий микрокалориметр, способный работать при давлениях до 6000 атмосфер [19, 20]. Проведенные испытания показали, что по своим техническим параметрам прибор не имеет аналогов. Для осуществления надежных измерений требуется не более 0.3 мг биологического материала (белки, нуклеиновые кислоты, липиды и т.д.). Подобные приборы, известные из международных

публикаций, способны работать в лучшем случае при давлениях до 200 атмосфер и имеют на порядок меньшую чувствительность. Прибор позволяет получать необходимую информацию о зависимости энтальпии конформационных переходов биологически важных макромолекул (белки, полинуклеиновые кислоты, липиды, полисахариды) от температуры и давления, что в свою очередь позволило приступить к систематическому изучению объемных изменений при конформационных превращениях биологически важных макромолекул. Данный обзор посвящен демонстрации возможностей метода сканирующей микрокалориметрии при высоком давлении и основных результатов, полученных за последние годы.

II. ФОСФОЛИПИДЫ

Липиды представляют важный структурный класс биологических макромолекул. Липиды являются амфифильными соединениями; молекулы имеют полярную головку и один или несколько гидрофобных «хвостов». Фосфолипиды – сложные эфиры многоатомных спиртов и высших жирных кислот. Они содержат остаток фосфорной кислоты и соединенную с ней добавочную группу атомов различной химической природы. В воде липиды способны образовывать бислойную структуру – основной элемент клеточных мембран. В бислое агрегированные молекулы липидов уложены в виде двух параллельных монослоев, обращенных друг к другу своими гидрофобными сторонами. Под воздействием температуры липидный бислой способен претерпевать фазовый переход (рис. 1). Низкотемпературное (гелевое) состояние – аналог твердого состояния. Высокотемпературное (жидкокристаллическое) состояние больше похоже на состояние жидкое, но имеет определенную степень порядка [21, 22].

При физиологических температурах липидные мембраны, как правило, находятся в области перехода, что позволяет им поддерживать высокий уровень флуктуационной подвижности. Уровень флуктуаций определяется в том числе коэффициентами расширения и сжатия. С другой стороны, механические свойства мембран, которые в значительной степени определяют такие биологически важные события как слияние мицелл, их изгиб, также связаны с объемными параметрами [23–25]. Таким образом, важно знать закономерности изменения энергетических и объемных параметров липидных мембран при переходе гель – жидкий кристалл.

Используя калориметрию при высоком давлении, мы детально изучили поведение основного конформационного перехода

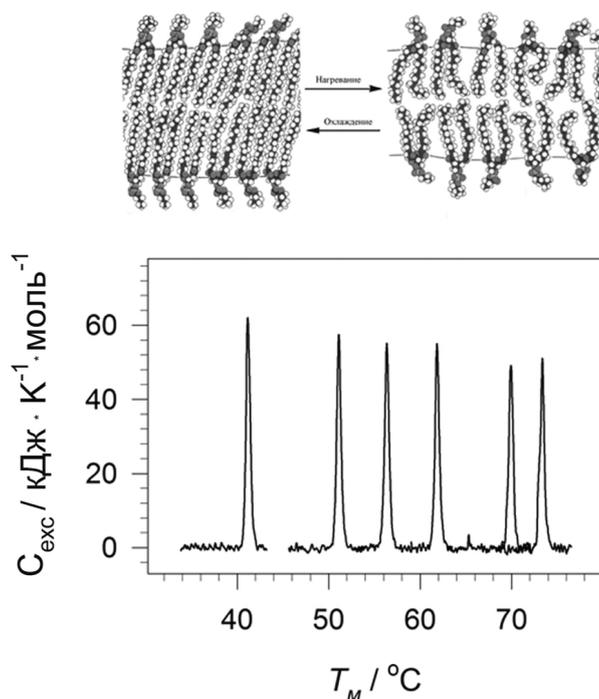


Рис. 1. Зависимости избыточной молярной парциальной теплоемкости дисперсии DPPC (1,2-диацилпальмитоилфосфатидилхолин) в воде от температуры при различных давлениях (внизу). Слева направо: 0.0981, 53.4, 84.1, 116.6, 164.3, 186.7 МПа. В верхней части рисунка – схематическое представление фазового перехода в липидной бислоидной мембране из низкотемпературной гель-фазы (слева) в высокотемпературную жидкокристаллическую фазу (справа).

(гель – жидкий кристалл) группы гомологичных фосфолипидов – 1,2-диацилфосфатидилхолинов с разной длиной гидрофобных хвостов [26–29]. Для примера на рис. 1 показаны кривые плавления DPPC (16:0 PC, 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) при различных давлениях. Было показано, что при увеличении длины «хвоста» температура перехода увеличивается нелинейным образом. Увеличение давления до 200 МПа (≈ 2000 атм) приводит к увеличению температуры плавления липидов приблизительно на 34° .

Нами был разработан математический аппарат, позволяющий анализировать полученные экспериментальные калориметрические данные и интерпретировать результаты [30, 31]. В результате нам удалось оценить скачки основных парциальных термодинамических

функций при переходе, включая скачки объема, а также скачки коэффициентов изотермической сжимаемости и изобарического коэффициента теплового расширения. Проанализирован характер зависимости термодинамических функций перехода от давления и длины ацильных цепей.

Было показано, что при переходе липидный бислои увеличивает свой парциальный объем не более, чем на несколько процентов (3.2 % для DPPC) при атмосферном давлении. Интересно заметить, что теплота плавления липидов этого класса в пересчете на одну метиленовую группу (CH_2) гидрофобного хвоста близка к значению для этой величины при плавлении алканов и полиэтилена. То есть в энергетическом плане появление определенной свободы движения CH_2 групп у полимерных материалов и таких же гидрофобных хвостов фосфатидилхолинов «стоит» приблизительно одинаково. Наличие воды с двух сторон липидного бислоя практически не сказывается на «энергетической стоимости» движения метиленовых групп.

Было показано, что теплота (энтальпия) плавления гомологичных липидов с одинаковой полярной головкой, но разными по длине гидрофобными ацильными хвостами пропорциональна длине (числу атомов углерода N) этого хвоста при любом давлении [22, 27, 28, 32–34]. Это же относится и к величине изменения объема при переходе.

$$\Delta H_N = \Delta h_{\text{CH}_2} (N - N_{\Delta H=0}), \quad (1)$$

$$\Delta V_N = \Delta v_{\text{CH}_2} (N - N_{\Delta V=0}). \quad (2)$$

где $N_{\Delta H=0}$ и $N_{\Delta V=0}$ – число атомов углерода в одной ацильной цепи липида, при котором изменение энтальпии и объема обращается в ноль. Δh_{CH_2} и Δv_{CH_2} – изменение энтальпии и объема при переходе, соответственно, в пересчете на одну метиленовую группу. Такое поведение связано с тем, что при удлинении достаточно длинных хвостов липидов на одну метиленовую группу число групп в пограничной области гидрофобного монослоя не меняется. Меняется только число практически эквивалентных метиленовых групп, сильно погруженных в гидрофобный слой. Ясно, что такой линейный характер зависимостей сохранится при любых условиях (рН, ионная сила, давление, температура).

Важный вывод следует из соотношений классической термодинамики. Можно утверждать, что если энтальпия перехода при какой-то длине ацильных «хвостов» $N_{\Delta H=0}$ обращается в ноль, то и изменение объема для этого липида при тех же условиях обязано обратиться в

ноль. Это следует, например, из соотношения Клайперона–Клаузиуса:

$$\Delta V_N = \Delta H_N \frac{d \ln T_m}{dP}. \quad (3)$$

Здесь T_m – абсолютная температура перехода, P – давление. Таким образом, в соотношениях (1) и (2) $N_{\Delta H=0} = N_{\Delta V=0}$, и

$$\Delta V_N = \Delta v_{CH_2} (N - N_{\Delta H=0}). \quad (4)$$

Иными словами, изменение энтальпии и изменение объема при переходе должно обращаться в ноль при одной и той же длине ацильной цепи. Из вышеупомянутых результатов можно сделать два нетривиальных вывода.

(а) Для гомологичных липидов с хвостами разной длины отношение изменения объем к изменению энтальпии есть постоянная величина, зависящая только от давления, но не от N .

$$\gamma(P) = \frac{\Delta V_N}{\Delta H_N}. \quad (5)$$

Соотношение (5) можно получить простым делением уравнения (4) на уравнение (2).

Впервые постоянство отношения изменения объема к изменению энтальпии было установлено эмпирически в работах [23, 24] путем сопоставления данных сканирующей микрокалориметрии и денситометрии при обычном давлении, но подтверждено и объяснено нами [27–29] методом сканирующей микрокалориметрии высокого давления.

Второе нетривиальное следствие (б), основанное на вышеупомянутых соображениях, выглядит следующим образом. Зависимости логарифма температур переходов от давления для гомологичных липидов на графиках всегда параллельны. Иными словами полная производная логарифма температуры перехода по давлению одинакова для всех гомологичных липидов. Это следует из соотношения Клайперона–Клаузиуса (3) и соотношения (5). Действительно, независимо от N

$$\frac{d \ln T_m}{dP} = \frac{\Delta V_N}{\Delta H_N} = \gamma(P). \quad (6)$$

Учитывая, что абсолютное значение температур переходов меняется незначительно, ясно, что и зависимости температур от давления также будут близки по наклону. На рис. 2 показаны зависимости температуры перехода гель – жидкий кристалл для фосфатидилхолинов [27].

Следует заметить, что из того, что плавление липидов – аналог плавления алканов, природа головки хотя и способна влиять на стабильность переходов, но не приводит к нарушению вышеупомянутой закономерности. То есть для липидов с другой головкой, но с такими же «хвостами» оба вышеупомянутых следствия также будут верны. Более того, значения отношения энтальпии к изменению объема для всех липидов с двумя ацильными цепями (и насыщенными связями), но с разными полярными головками будут близки.

Интересная закономерность была установлена нами при теоретическом анализе влияния давления на одностадийный переход [31]. Оказалось, что в зависимости от соотношения кажущегося коэффициента расширения перехода $\alpha_m = 1/\Delta V(\partial\Delta V/\partial T)_p$ и обратной температуры перехода энтальпия (теплота) перехода может уменьшаться или расти. Если коэффициент расширения большей $\alpha_m > T_m^{-1}$, энтальпия будет уменьшаться с ростом давления ($d\Delta H_m/dP < 0$), а при $\alpha_m < T_m^{-1}$ энтальпия будет расти ($d\Delta H_m/dP > 0$). При $\alpha_m = T_m^{-1}$ энтальпия не будет зависеть от давления ($d\Delta H_m/dP = 0$). Здесь ΔH_m и T_m – энтальпия и температура плавления.

Такое поведение энтальпии плавления с ростом давления мы наблюдали при изучении диацилфосфатидилхолинов с разной длиной хвоста [28]. Если у коротких липидов энтальпия перехода растет, то у длинных она падает, и это связано именно с тем, что коэффициент α_m изменяется соответствующим образом. Так как зависимость энтальпии ΔH_m от N носит линейный характер, ясно, что существует такая длина N_v некоего виртуального липида, у которого энтальпия перехода не будет зависеть от давления. Нами было показано, что этот виртуальный липид в случае фосфатидилхолинов будет иметь длину $N_v \approx 15.5$ и энтальпию $\Delta H_{m,v} \approx 31$ кДж/моль. Исходя из всего перечисленного, следует, что графическое представление линейной функции энтальпии перехода от N с ростом давления будет вращаться вокруг точки с координатами N_v и $\Delta H_{m,v}$, которая соответствует виртуальному липиду (см. рис. 3). Из рисунка также видно, что с ростом давления точка пересечения зависимости энтальпии от N с осью абсцисс $N_{\Delta H=0}(P)$ смещается в область более коротких липидов. Например, при атмосферном давлении $N_{\Delta H=0} \approx 10.9$, а при 200 МПа эта точка смещается до $N_{\Delta H=0} \approx 9.1$. Наличие точки пересечения означает, что при обычном давлении гель-фаза для коротких липидов

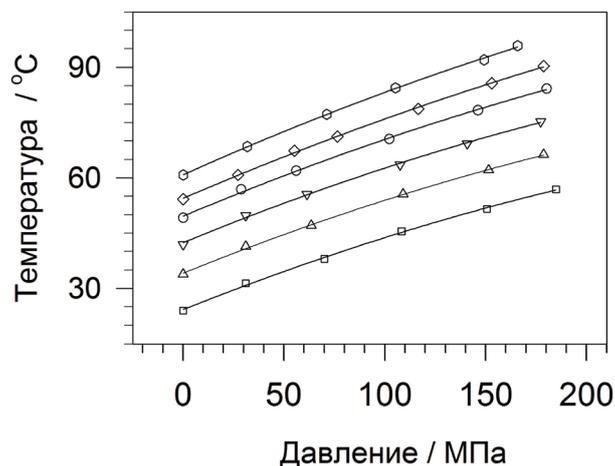


Рис. 2. Зависимости температур «плавления» мультиламеллярных везикул 1,2-диацилфосфатидилхолинов в воде при различных давлениях (использованы данные из [27]). Непрерывные линии показывают наилучшие квадратичные приближения экспериментальных зависимостей. Зависимости соответствуют (снизу вверх) липидам с длиной ацильных цепей от 14 атомов углерода (14:0 PC) до 19 атомов углерода (19:0 PC). Используются следующие обозначения: 14:0 PC (\square), 15:0 PC (\triangle), 16:0 PC (∇), 17:0 PC (\circ), 18:0 PC (\diamond), and 19:0 PC (\odot).

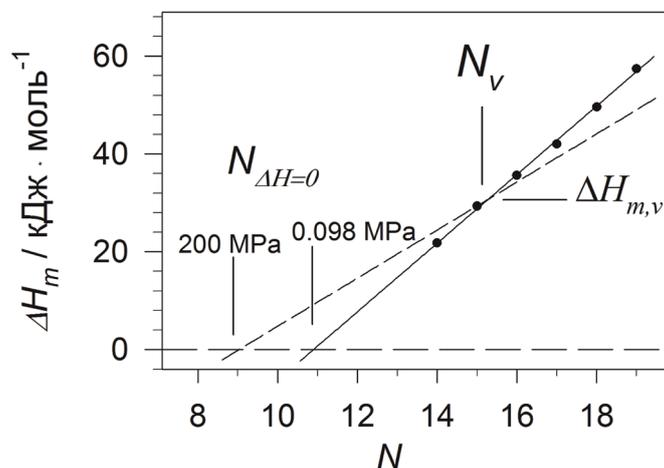


Рис. 3. Зависимости энтальпии плавления 1,2-диацилфосфатидилхолинов в воде от длины ацильных цепей N (адаптировано из [28]). Непрерывная линия показывает наилучшее приближение экспериментальной зависимости, полученной при атмосферном давлении линейной функцией. Штрихпунктирная линия соответствует давлению 200 МПа (вычислена на основе экспериментальных данных).

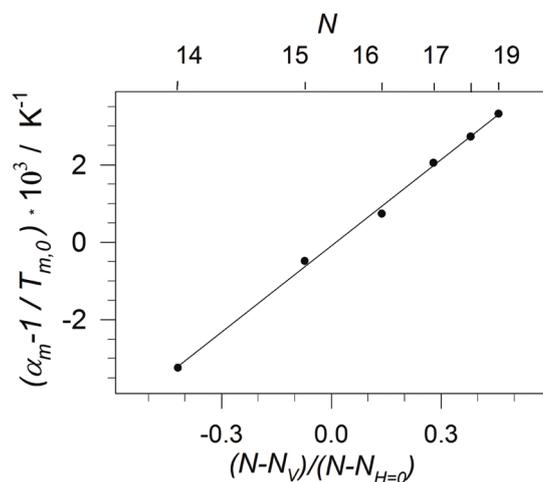


Рис. 4. Зависимость разницы между кажущимся коэффициентом изобарического расширения перехода и обратной температурой перехода при постоянном давлении от параметра $(N - N_v) / (N - N_{\Delta H=0})$ (см. текст), зависящего от длины ацильной цепи N (верхняя ось абсцисс). Данные адаптированы из [28]. Непрерывной линией показано наилучшее приближение зависимости линейной функцией.

($N < 12$) энергетически невыгодна и такие липиды будут находиться в жидкокристаллической форме при любой температуре, естественно, если они вообще будут способны образовывать бислойную структуру. При давлении 2000 атм и более гелевое состояние, вероятно, может быть обнаружено и у липидов с N равным 10 и 11 атомов углерода.

Наличие вышеуказанной специфической связи между длиной гидрофобного хвоста липида, его энтальпией плавления и давлением накладывает определенные ограничения на зависимость коэффициентов теплового расширения и изотермического сжатия с длиной хвоста липида. Как показано нами [28], эти коэффициенты являются нелинейными функциями N , однако функция становится линейной, если в качестве аргумента использовать параметр $(N - N_v) / (N - N_{\Delta H=0})$ (рис. 4).

III. ПЕРЕХОД КЛУБОК – ГЛОБУЛА МОДЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕМПЕРАТУРЫ

«Умные» (smart), стимул-зависимые полимеры, способные к самоорганизации в водной среде, весьма перспективны для решения различных биомедицинских задач, начиная от адресной доставки лекарств, кончая экспрессией генов и моделированием поведения белков и ферментов [35, 36]. Выяснение принципов и механизмов самоорганизации таких полимеров в водных растворах, а также теоретическое описание их поведения имеют фундаментальное значение для полимерной науки. В случае амфифильных полимеров самоорганизации определяется балансом гидрофобных и гидрофильных элементов в их структуре. Факторы внешнего воздействия могут сдвигать этот баланс, вызывая внутри- и межмолекулярную ассоциацию химических групп полимера и образование упорядоченных структур (глобулы, мицеллы, сети и т.д.). Температура является одним из наиболее важных параметров окружающей среды. Некоторые термочувствительные полимеры в водной среде, как известно, способны претерпевать обратимые кооперативные переходы типа «клубок – глобула», физическая природа и механизмы которого фундаментально связаны с переходами в белках [37–39]. Такими полимерами являются, например, поли(N-изопропилакриламид) (PNIPAM) [40], и поли(винил метиловый эфир) (PVME) [41] (рис. 5).

PNIPAM представляет собой химический изомер полилейцина, имеющий полярную пептидную группу не в основной, а в боковой цепи. При нагревании PNIPAM в водном растворе претерпевает переход типа клубок–глобула, который можно рассматривать как внутримолекулярный переход из состояния развернутого в состояние расплавленной глобулы [42]. Подобный переход, но, возможно, более сложный, наблюдается и у PVME [43]. Физическая природа и механизм этих переходов, и перехода связанного с ренатурацией белков, в определенной степени подобны [37–39]. Процесс, как и в случае белков, сопровождается значительным отрицательным скачком теплоемкости. Последнее указывает на существенную дегидратацию гидрофобной поверхности в обоих случаях. В ходе экспериментов были получены зависимости температуры и энтальпии перехода от давления в диапазоне от 1 атм до 2000 атм.

В случае PNIPAM, увеличение давления приводит к уменьшению энтальпии и увеличению полуширины перехода, в то время как температура перехода в этом диапазоне давлений проходит через максимум [44] (рис. 5). Соответственно изменение парциального объема при переходе положительно при низких давлениях и отрицательно при высоких.

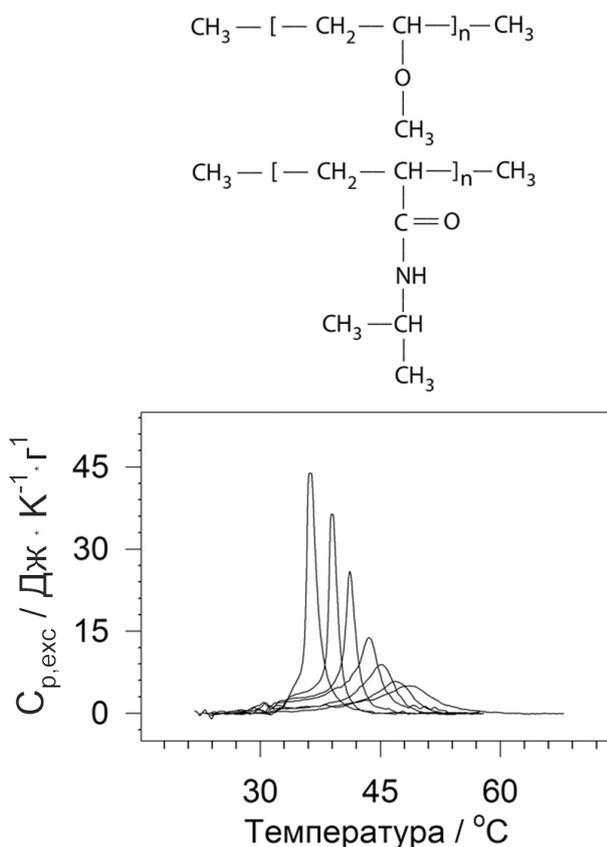


Рис.5. Зависимости парциальной избыточной теплоемкости PNIPAM от температуры (внизу) при давлениях: 1 – 0,0981 (атмосферное давление); 2 – 38.2; 3 – 52.3; 4 – 91.1; 5 – 127; 6 – 156; 7 – 201 МПа. В верхней части рисунка приведены структурные химические формулы PVME и PNIPAM (сверху вниз).

В случае PVME термограммы разделения фаз имели более сложный характер [45]. При плавлении имеется две особые точки: точку ($T_{t,1}$, бинадаль) и точку сосуществования трех фаз ($T_{t,2}$). С ростом давления температура $T_{t,1}$ падает на 10 °С, а температура $T_{t,2}$ увеличивается на 15 °С, при этом энтальпия перехода уменьшается в 1,5 раза, а скачок теплоемкости остается практически неизменным. Полученные данные показывают, что последовательные фазовые переходы, которые претерпевает разбавленный водный раствор поли(винил метиловый эфир) при нагревании, имеют разную природу.

IV. БЕЛКИ

Создание всесторонней адекватной модели стабилизации структуры глобулярных белков, в том числе учитывающей и объемные эффекты – один из важных и крайне необходимых этапов развития физики белка [46]. Данное направление науки интенсивно развивалось в течение последних десятилетий. В частности, экспериментально была показана применимость модели двух состояний для денатурации однодоменных глобулярных белков [47–48]. Оценен вклад различных взаимодействий в энтальпию и энергию стабилизации структуры белков [49]. Было установлено, что существенный вклад в стабилизацию структуры вносят, в частности, так называемые гидрофобные взаимодействия [50–52].

Известно, что разворачивание (денатурация) глобулярных белков сопровождается большим изменением (скачком) его теплоемкости [47, 53]. Известно также, что столь же большие изменения теплоемкости сопровождают и гидратацию неполярных соединений [54–56]. Эти факты, а также дегидратация неполярной поверхности молекулы белка в ходе самосборки ее пространственной структуры послужили основой для предположения о том, что гидратация неполярных групп при денатурации является основной причиной большого денатурационного скачка теплоемкости белков. Было показано наличие количественного соответствия между площадью неполярной поверхности белков, дополнительно гидратируемой в результате денатурации, и денатурационным скачком теплоемкости [57]. Вклад гидратации полярной поверхности в скачок теплоемкости обычно не превышает 20% [55, 56]. Таким образом, денатурационный скачок теплоемкости может считаться мерой количества гидрофобной поверхности, дополнительно гидратируемой в результате денатурации. Приваловым и Махатадзе был разработан алгоритм, позволяющий на основании структуры белка в нативном состоянии и данных по переносу модельных соединений из неполярного растворителя в воду оценивать некоторые термодинамические функции стабилизации его структуры [49, 55, 58,]. Таким образом, казалось, модель переноса гидрофобных групп – удачная модель для объяснения наличия денатурационного скачка теплоемкости и оценки термодинамических функций стабилизации нативной структуры глобулярных белков.

К сожалению, не столь удачно наше понимание причин изменения объема при денатурации белков. Обычно величина денатурационного инкремента объема не превышает 1.0% от полного молекулярного объема молекулы белка и составляет в большинстве случаев величину порядка десяти миллилитров на моль [59, 60]. Несмотря на малую

величину, денатурационный инкремент объема – важный термодинамический параметр, определяющий в частности, как повышение давления будет сказываться на стабильности структуры белка.

Факторы, способные вносить вклад в изменение объема белков при денатурации более или менее известны [60, 61]. Первой и наиболее очевидной причиной изменения объема при денатурации является наличие полостей, не заполненных растворителем в его нативной структуре. Следующий существенный вклад может быть обусловлен хорошо известным явлением изменения объема жидкости под воздействием молекулярных электрических полей – так называемой электрострикцией [59, 62]. В частности, хорошо известно существование в белках аномально титруемых групп, изменяющих свой заряд при денатурации, что способно привести к изменению термодинамического объема молекулы [63, 64]. Изучение гидратации модельных соединений показало, что изменение объема молекулы белка при денатурации за счет гидратации дополнительной поверхности полипептидной цепи также может быть существенно [65]. Ясно также, что существуют и другие типы взаимодействий, например, образование водородной связи, способные привести к изменению объема [61, 66].

Важно заметить, что все из перечисленных вкладов в расчете на одну боковую группу имеют приблизительно один и тот же порядок величины, что и денатурационный инкремент объема всей молекулы белка. Таким образом из самых общих соображений следует, что величина денатурационного инкремента объема (изменение объема в результате денатурации) определяется как компромисс между множеством вкладов различной природы, сравнимых по величине с результирующим объемом. Это существенно усложняет задачу по точной теоретической оценке денатурационного инкремента объема.

Попытки использовать данные по переносу модельных соединений из жидкого гидрофобного окружения в воду для оценки денатурационных инкрементов объема сразу же натолкнулись на серьезные трудности. В частности, еще Козман [67] заметил, что «модель переноса жидких углеводов терпит почти полную неудачу при попытке применить ее к воздействию давления на сворачивание белков».

Подобные выводы сделали и некоторые другие авторы [62, 68]. Основанием для этого послужили следующие соображения. Небольшая неполярная молекула при переносе из жидкой углеводородной окружающей среды в воду при обычном давлении уменьшает свой термодинамический объем на 10–20 мл/моль. Увеличение давления

приводит к росту этого изменения до небольшой положительной величины (около 5 мл/моль) [69–70]. Следовательно, если гидрофобное ядро белка имеет сходство с жидкими углеводородами и если существенное число неполярных групп (скажем 10 или 20) экспонируется в воду при денатурации белка, тогда при обычном давлении ΔV должно быть большим по абсолютной величине и отрицательным (–100 – –400 мл/моль), а при больших давлениях – небольшим положительным (от 50 до 100 мл/моль). Как правило, белки не ведут себя так, как описано выше. При низких давлениях ΔV принимает небольшие положительные или отрицательные значения, а при повышении давления значения ΔV могут уменьшаться и принимать отрицательные значения до десятков миллилитров на моль белка [5, 62, 69, 71]. Данное явление в литературе известно как объемный парадокс белка [72].

Обращает на себя внимание еще одна неясность в данном вопросе. Все вышеуказанные явления при низком давлении способны вносить только отрицательные вклады в суммарный инкремент денатурационного объема, и не ясно, что делает этот объем малым, или даже положительным. В отличие от отрицательных вкладов, происхождение положительных вкладов в денатурационный инкремент объема вызывает споры. В данном случае мы не имеем в виду положительный вклад в инкремент объема, вызванный протонированием аномально титруемых групп. Данное явление хотя и реально существует [63, 64], но может оказывать влияние на денатурационный инкремент объема лишь в узкой области рН, где степень диссоциации групп в нативном и денатурированном состоянии заметно отличается.

Внутренне противоречивой является также гипотеза о доминирующем вкладе внутренних полостей в структуре белков в суммарный денатурационный инкремент объема. Существует группа исследований, авторы которых фактически отрицают вклад дополнительной гидратации и электрострикции при денатурации, что противоречит данным по модельным соединениям. Авторы этих работ считают, «что давление разворачивает белки главным образом благодаря полостям, которые присутствуют в свернутом состоянии, и отсутствуют в развернутом» [73, 74].

Учитывая вышеуказанные противоречия в понимании природы причин положительного вклада в денатурационный инкремент объема, несколькими авторами была предложена модель, согласно которой денатурацию при высоком давлении правильной моделировать не процессом гидратации неполярных соединений, а наоборот процессом переноса молекул воды в неполярную среду – гидрофобное ядро молекулы белка [62, 72, 75]. Как известно, изменение объема

для переноса воды в дихлорэтан составляет +2 мл/моль, перенос воды в бензол или трихлорэтан приводит к изменению объема +4 мл/моль, в случае переноса воды в четыреххлористый углерод изменение объема может достигать +14 мл/моль [76]. Впервые такая модель была предложена для объяснения влияния высокого давления на скорость денатурации глобулярных белков [77]. Было показано, что при повышенном давлении активационная энтальпия становится отрицательной. Модель предполагала, что повышение давления приводит к проникновению отдельных молекул воды в белковое гидрофобное ядро, что сопровождается существенным выделением тепла. Гипотеза была предложена для моделирования активированного состояния, но в дальнейшем была распространена и на равновесное денатурированное состояние.

Для проверки этой гипотезы нами было изучено воздействие высокого давления на денатурацию лизоцима и РНКазы [78]. Главным экспериментальным результатом этой нашей работы было доказательство отсутствия существенного влияния высокого давления на денатурационный скачок теплоемкости ΔC_p глобулярных белков при давлениях вплоть до 2000 атм (рис. 6). Как мы уже упоминали, денатурационный скачок теплоемкости глобулярных белков есть прямое следствие гидрофобного эффекта. Изменение скачка теплоемкости при повышенном давлении могло быть обусловлено двумя факторами, а именно ослаблением этого эффекта из-за изменения структуры воды вблизи гидрофобной поверхности под воздействием давления и/или с изменением количества дополнительно гидратируемой при денатурации поверхности молекулы белка. Отсутствие существенных изменений ΔC_p означает отсутствие заметного влияния давления на вышеуказанные факторы.

Отсутствие заметного влияния высокого давления на скачок теплоемкости подтверждается и результатами работы [71], где показано, что использование предположения о постоянстве скачка теплоемкости позволяет построить непротиворечивую фазовую диаграмму для химотрипсина при давлениях до 7000 атм. Полученная фазовая диаграмма хорошо согласуется с экспериментально обнаруженной температурой холодной денатурации при повышенном давлении. Надо заметить, что явление холодной денатурации в принципе невозможно, если денатурационный скачок теплоемкости стремится к нулю. Это следует из того, что при нулевом ΔC_p энергия Гиббса будет линейной функцией температуры и не может обращаться в ноль при двух различных температурах. Сам факт существования холодной денатурации при высоком давлении подтверждает сохранение боль-

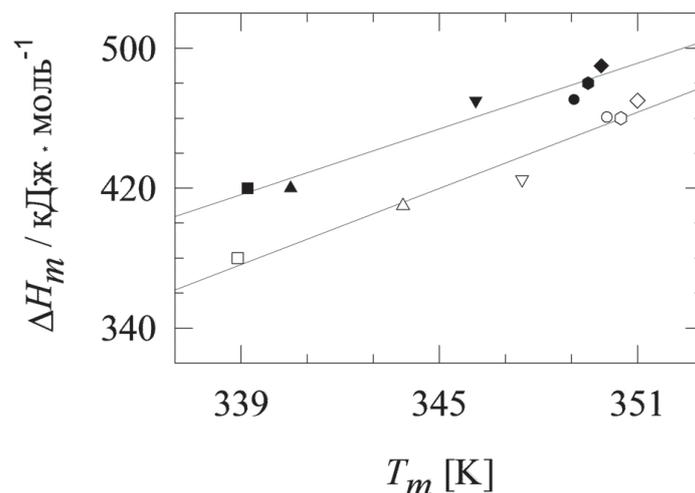


Рис. 6. Зависимости энтальпии денатурации лизоцима от температуры денатурации при атмосферном давлении (закрашенные символы) и при 178 МПа (незакрашенные символы). Экспериментальные точки получены при следующих значениях pH: 2.50 (□), 2.75 (△), 3.00 (▽), 4.00 (○), 4.50 (◇) и 5.00 (⊙). Прямые линии соответствуют наилучшим приближениям экспериментальных зависимостей линейными функциями.

ших значений скачка теплоемкости при высоких давлениях [79–82].

Следующий важный вывод – отсутствие принципиальных изменений природы гидратации и площади гидрофобной поверхности, дополнительно гидратируемой при денатурации. Под природой гидратации здесь мы понимаем свойства воды, проникающей в гидрофобное ядро белка. Проникает ли вода в виде отдельных молекул или небольших групп молекул, теряя при этом свои макроскопические свойства (например, поверхностное натяжение или способность по определенным законам гидратировать отдельные неполярные молекулы), или она сохраняет свои свойства как жидкости? Наши данные говорят о том, что при денатурации глобулярных белков не может быть такой ситуации, когда при низком давлении разворачивание молекулы и гидратация гидрофобных групп соответствует переносу неполярных соединений в воду, а при высоком давлении разворачивание уже должно моделироваться переносом отдельных молекул воды в неполярное окружение. Изменение характера гидратации неизбежно привело бы к существенному уменьшению скачка теплоемкости и, возможно, к изменению кооперативности денатурации. Ничего подобного мы не наблюдаем. Аргу-

менты о том [72], что при высоких давлениях в денатурированном состоянии присутствует заметное количество вторичной структуры, а гидродинамические размеры белка в денатурированном состоянии существенно меньше, чем, например, в денатурантах, ничего не доказывают. Некоторые белки, денатурированные теплом, а также белки, денатурированные холодом, при обычном давлении ведут себя подобным образом (высокая степень вторичной структуры и относительно малые размеры) [83], однако при этом скачок теплоемкости у них согласуется с моделью переноса. Вероятно, и при высоком давлении объемы проникающей в денатурированный белок воды достаточны, чтобы можно было считать ее макроскопическим объектом.

Таким образом, фундаментальным следствием полученных результатов является то, что процесс денатурации и степень гидратации неполярных групп при атмосферном и повышенном до 2000 атмосфер давлении очень похожи. Модели, предполагающие существенное изменение характера гидратации глобулярных белков в денатурированном состоянии при высоком давлении, вряд ли можно признать правильными. Это подтверждают и прямые измерения гидратной оболочки атома криптона методом абсорбционной рентгеновской спектроскопии [84]. Авторы статьи указывают, что «в противоположность тому, что полагали ранее, гидратная оболочка гидрофобного атома обладает высокой устойчивостью к любым возмущениям давлением».

Нами также было проведено исследование влияния высокого давления на денатурационный переход белка коллагена [85]. Как известно, коллаген имеет специфическую спиральную структуру. Коллаген образует 2–3 внутримолекулярные водородные связи на три аминокислотных остатка и не имеет гидрофобного ядра [86]. На рис. 7 показаны избыточные парциальные теплоемкости коллагена при нескольких давлениях. Как видно из рисунка, увеличение давления стабилизирует структуру коллагена, но не сказывается на кооперативности его денатурационного перехода. Давление заметно понижает энтальпию денатурации. В отличие от денатурации большинства глобулярных белков денатурация коллагена происходит с увеличением удельного парциального объема при нормальном давлении. Более того, изменение объема коллагена по абсолютной величине заметно выше, чем у большинства белков. При увеличении давления изменение объема уменьшается благодаря различию в сжимаемости белка в свернутом и развернутом состояниях. Этот эффект в небольшой степени компенсируется различиями в коэффициентах теплового расширения.

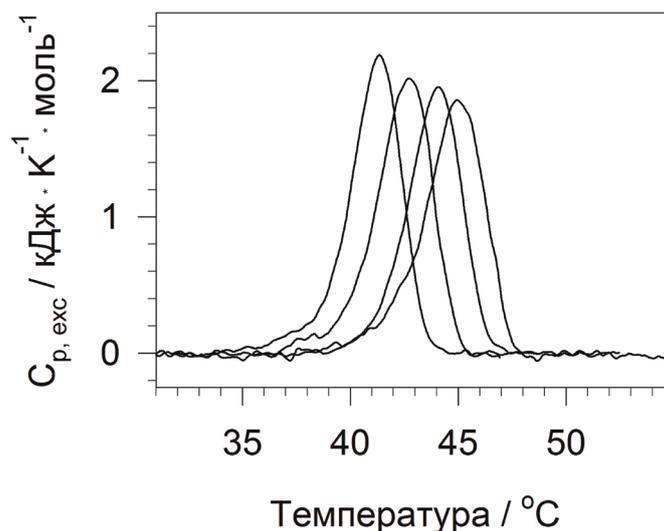


Рис. 7. Избыточная молярная (на один аминокислотный остаток) парциальная теплоемкость коллагена в водном растворе при различных давлениях. Давление (слева направо): 0.0981, 41.3, 108, 180 МПа.

Возвращаясь к выяснению природы положительного вклада в денатурационный инкремент объема белков, следует упомянуть, что коллаген очень удобен для прояснения обсуждаемого вопроса. Существенным его отличием от глобулярных белков является отсутствие гидрофобного ядра и как следствие относительно небольшая гидрофобная поверхность гидратируемая при денатурации. Оказалось [85], что при нормальном давлении денатурационный инкремент объема коллагена составляет $+1.1 \cdot 10^{-2} \text{ см}^3 \text{ г}^{-1}$, что намного больше величин, наблюдаемых у глобулярных белков ($\sim 10^{-3} \text{ см}^3 \text{ г}^{-1}$). Поскольку при денатурации коллагена происходит лишь разрыв внутримолекулярных водородных связей и увеличение подвижности полипептидной цепи, а вода получает дополнительный доступ в основном к полярной поверхности, очевидно, что именно эти события способны приводит к большому увеличению объема. Таким образом, большой положительный вклад в денатурационный инкремент объема любых белков при обычном давлении способен дать освобождение самой полипептидной цепи с ее последующей гидратацией. Что касается внутримолекулярных водородных связей, то очевидно, что они приводят к уменьшению физического объема молекул в нативной конформации и, следовательно, также должны давать

положительный вклад в денатурационный инкремент объема при отсутствии гидратации освободившихся групп. Однако в случае разрыва внутримолекулярных водородных связей с последующим образованием водородных связей с молекулами воды результирующий вклад в инкремент объема может оказаться любого знака.

V. СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОБЪЕКТАХ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Несмотря на различие химической структуры изученных объектов, сопоставление полученных результатов позволяет лучше понять природу денатурационного инкремента объема белков. Как известно, денатурация глобулярных белков сопровождается дополнительной гидратацией ранее скрытых от воды гидрофобных групп. Существенное увеличение парциальной теплоемкости (скачок теплоемкости) белка обусловлено именно этим явлением. Кроме того, при денатурации наблюдается существенное увеличение подвижности всех групп, в том числе и гидрофобных, расположенных в ядре молекулы. Некоторое время назад при анализе причин кооперативности денатурации было введено понятие «сухой расплавленной глобулы» [87]. Предполагалось, что при определенных условиях нативный белок мог бы претерпевать кооперативный переход, в результате которого элементы структуры существенно увеличили бы свою подвижность благодаря небольшому уменьшению плотности укладки молекулы (увеличение размеров глобулы). Предполагалось также, что доступность гидрофобных групп для воды в результате такого перехода практически не меняется. Переход молекулы белка из нативного состояния в состояние «сухой расплавленной глобулы» можно рассматривать как определенную аналогию с плавлением твердых веществ. Молекула белка переходит из состояния «квазикристаллического» в состояние «квазжидкое». Используя эту терминологию, денатурацию белка в целом можно рассматривать как двухстадийный процесс: (а) переход из плотно упакованного состояния с низкой подвижностью боковых групп в состояние «сухой расплавленной глобулы» и (б) переход из «сухой расплавленной глобулы» в развернутое хорошо гидратированное состояние.

Возвращаясь к «объемному белковому парадоксу», можно констатировать, что изученные нами объекты являются достаточно хорошими моделями, способными в заметной степени прояснить причину установленных ранее противоречий. В частности, переход гель – жидкий кристалл в липидах это переход из состояния, когда гидрофобные группы дегидратированы и их движение в значитель-

ной степени заторможено в состоянии с дегидратированными, но расторможенными гидрофобными группами. Исходное состояние в определенной степени может моделировать нативное состояние белка, конечное состояние в вышеуказанном смысле похоже на «сухую расплавленную глобулу» (переход а). В силу отсутствия дополнительной гидратации гидрофобной поверхности в результате перехода скачок теплоемкости практически отсутствует (см. таблицу). Переход сопровождается большим поглощением тепла (220 Дж/г) и относительно большим увеличением парциального объема ($16 \cdot 10^{-2}$ см³/г). Переход также характеризуется относительно большим отношением изменения объема к изменению энтальпии ($7.1 \cdot 10^{-4}$ см³/Дж), что говорит о значительной зависимости температуры такого перехода от давления. Последнее утверждение следует из уравнения Клайперона–Клаузиуса (6).

Таблица. Термодинамические параметры термотропных переходов у объектов различной химической природы при атмосферном давлении

Параметры / Объект	Липиды (на CH ₂ группу)	Коллаген	РНКаза	PNIPAM	PVME
Тип перехода	Гель–жидкий кристалл	Супр-спираль–клубок	Плотно упакованная глобула–клубок	Клубок–дегидратированная расплавленная глобула	Клубок–дегидратированная расплавленная глобула
Δh (Дж/г)	220	72	34	от 56 (низкое P) до 32 (высокое P)	от 88 (низкое P) до 50 (высокое P)
Δc_p (Дж/г/град)	<0.05	<0.05	0.41	–0.75	–1.2
$\Delta V / 10^{-2}$ (см ³ /г)	16	1.1	0.03	от 2 (низкое P) до –6 (высокое P)	
$\Delta V / \Delta h / 10^{-4}$ (см ³ /Дж)	7.1	1.5	0.1	от 3.6 (низкое P) до –19 (высокое P)	

Обозначения: Δh и ΔV – парциальные изменения (инкременты) энтальпии и объема при переходе; Δc_p – парциальный скачок (инкремент) теплоемкости. PNIPAM – поли(N-изопропилакриламид), PVME – поли(винилметилловый эфир). Данные по липидам относятся к фосфатидилхолину.

Переход из высокотемпературной формы PNIPAM (глобула) в низкотемпературную (клубок) это переход из состояния, когда гидрофобные группы существенно дегидратированы, но их движение расторможено (состояние похоже на «сухую расплавленную глобулу») в состояние с гидратированными расторможенными гидрофобными группами (случай б). Конечное состояние в этом смысле похоже на денатурированное состояние белка. В силу большой дополнительной гидратации гидрофобной поверхности переход сопровождается (см. таблицу) большим скачком теплоемкости ($\sim 1 \text{ Дж} \times \text{г}^{-1} \times \text{град}^{-1}$), заметным выделением тепла (-56 Дж/г) и заметным уменьшением объема ($-2 \times 10^{-2} \text{ см}^3/\text{г}$).

Таким образом, из двух вышеуказанных результатов следует, что переход (а) белка из состояния нативного в состояние «сухой расплавленной глобулы» должен сопровождаться большим поглощением тепла и большим увеличением объема. Последующий переход (б) из состояния «сухой расплавленной глобулы» в развернутое гидратированное состояние значительно компенсирует энтальпийную денатурации и способен на порядок уменьшить денатурационный инкремент объема. В связи с этим интересно заметить, что небольшая неполярная молекула при переносе из жидкой углеводородной окружающей среды в воду при обычном давлении уменьшает свой термодинамический объем на 10–20 мл/моль, что способно компенсировать увеличение объема при «сухом» плавлении белковой глобулы, приходящееся на боковую группу из 4–8 метиленовых групп.

Таким образом, основной причиной появления кажущегося «объемного белкового парадокса» является предположение о допустимости моделирования гидратации неполярных групп гидрофобного ядра при денатурации белка их переносом из жидкого углеводородного окружения в воду. Однако этот процесс моделирует только вторую стадию денатурации (стадия б). Судя по результатам перехода липидов гель-жидкий кристалл, плотность упаковки углеводородных цепей до температуры плавления намного больше, чем плотность жидких углеводородов. Возможно, лучшей моделью для этого может быть перенос гидрофобных групп из твердого неполярного окружения в воду.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог проведенным исследованиям, можно утверждать, что сканирующая микрокалориметрия при высоком давлении способна давать уникальную информацию об объемных изменениях при конформационных переходах макромолекул. Полученные результаты

позволяют надеяться, что этот метод будет способствовать дальнейшему развитию физики макромолекул и созданию адекватных моделей стабилизации их структуры, учитывающих в том числе объемные эффекты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C. (1996) High pressure effects on protein structure and function, *Proteins*, **24**, 81–91.
2. Panick, G., Malessa, R., Winter, R., Rapp, G., Frye, K.J., Royer, C.A. (1998) Structural Characterization of the Pressure-denatured State and Unfolding/Refolding Kinetics of Staphylococcal Nuclease by Synchrotron Small-angle X-ray Scattering and Fourier-transform Infrared Spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, **275**, 389–402.
3. Robinson, C.R., Sigar, S.G. (1995) Hydrostatic and Osmotic Pressure as Tools to Study Macromolecular Recognition, *Methods in Enzymology*, **259**, 395–427.
4. Takeda, N., Kato, M., Taniguchi, Y. (1995) Pressure – and thermally-induced reversible changes in the secondary structure of ribonuclease a studies by FT-IR spectroscopy, *Biochemistry*, **34**, 5980–5987.
5. Yamaguchi, T., Yamada, H., Akasaka, K. (1995) Thermodynamics of Unfolding of Ribonuclease A under High Pressure. A Study by Proton NMR, *J. Mol. Biol.*, **250**, 689–694.
6. Edb C. (1998) Refolding of recombinant proteins, *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 157–163.
7. Chrnyk, B.A., Evans, J., Lillquist, J., Young, P., Wetzel, R. (1993) Inclusion body formation and protein stability in sequence variants of interleukin-1 beta, *J. Biol. Chem.*, **268**, 18053–18061.
8. King, J, Haase-Pettingell, C., Robinson, A.S., Speed, M., Mitraki, A. (1996) Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates, *FASEB J.*, **10**, 57–66.
9. Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J., King, J. (1991) Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation, *Science*, **253**, 54–58.
10. Panda, M., Gorovits, B.M., Horowitz, P.M. (2000) Productive and nonproductive intermediates in the folding of denatured rhodanese, *J. Biol. Chem.*, **275**, 63–70.
11. Speed, M.A., Wang, D.I., King, J. (1996) Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition, *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1283–1287.
12. Gorovits, B.M., Horowitz, P.M. (1998) High hydrostatic pressure can reverse aggregation of protein folding intermediates and facilitate acquisition of native structure, **37**, 6132–6135.
13. St John, R.J., Carpenter, J.F., Randolph, T.W. (1999) High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 13029–13033.
14. Denys, S., Ludikhuyze, L.R., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2000) Modeling conductive heat transfer and process uniformity during batch high-pressure processing of foods, *Biotechnol. Prog.*, **16**, 92–101.
15. Buckow, R., Sikes, A., Tume, R. (2013) Effect of High Pressure on Physicochemical Properties of Meat, *Critical reviews in food science and nutrition*, **53**, 770–786.
16. Tauscher, B. (1995) Pasteurization of food by hydrostatic high pressure:

- chemical aspects, *Z. Lebensm Unters. Forsch.*, **200**, 3–13.
17. Summit, M., Scott, B., Nielson, K., Mathur, E., Baross, J. (1998) Pressure enhances thermal stability of DNA polymerase from three thermophilic organisms, *Extremophiles*, **2**, 339–345.
 18. Sun, M.M., Tolliday, N., Vetriani, C., Robb, F.T., Clark, D.S. (1999) Pressure-induced thermostabilization of glutamate dehydrogenase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*, *Protein Sci.*, **8**, 1056–1063.
 19. Senin, A. A., Dzhavadov, L. N., Potekhin, S. A. (2016) High-pressure differential scanning microcalorimeter, *Rev. Sci. Instrum.*, **87**, 034901.
 20. Потехин, С.А., Сенин, А.А., Абдурахманов, Н. Н., Межбурд, Е. В. «Дифференциальный адиабатный сканирующий микрокалориметр высокого давления». Патент №2364845 с приоритетом изобретения от 19 марта 2008 г. Зарегистрирован 20 августа 2009 года.
 21. Melchior, D.L., Steim, J.M. (1976) Thermotropic transitions in biomembranes, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **5**, 205–238.
 22. Marsh, D. (1991) General features of phospholipid phase transitions, *Chem. Phys. Lipids*, **57**, 109–120.
 23. Heimburg, T. (1998) Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta*, **1415**, 147–162.
 24. Ebel, H., Grabitz, P., Heimburg, T. (2001) Enthalpy and Volume Changes in Lipid Membranes. I. The Proportionality of Heat and Volume Changes in the Lipid Melting Transition and Its Implication for the Elastic Constants, *J. Phys. Chem. B*, **105**, 7353–7360.
 25. Grabitz, P., Ivanova, V.P., Heimburg, T. (2002) Relaxation kinetics of lipid membranes and its relation to the heat capacity, *Biophys. J.*, **82**, 299–309.
 26. Potekhin, S.A., Senin, A.A., Abdurakhmanov, N.N., Khusainova, R.S. (2008) High pressure effect on the main transition from the ripple gel P'_β phase to the liquid crystal (L_α) phase in dipalmitoylphosphatidylcholine. Microcalorimetric study, *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)*, **1778**, 2588–2593.
 27. Potekhin, S.A., Senin, A.A., Abdurakhmanov, N.N., Khusainova, R.S. (2011) Thermodynamic invariants of gel to the liquid-crystal 1,2-diacylphosphatidylcholines transition, *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)*, **1808**, 1806–1810.
 28. Potekhin, S.A., Senin, A.A., Khusainova, R.S. (2013) Thermodynamics of the gel to liquid crystal 1,2-diacylphosphatidylcholines transition. High-pressure microcalorimetry, *Thermochimica Acta*, **560**, 17–26.
 29. Potekhin, S.A., Khusainova, R.S. (2017) Acyl chain length dependencies of energy and volume dependent parameters upon the gel to liquid-crystal transition of 1,2-diacylphosphatidylcholines. Theoretical consideration. *Biophys. Chem.* **227**, 29–33.
 30. Потехин, С.А. (2012) Возможности сканирующей микрокалориметрии при изучении термотропных конформационных превращений биомакромолекул, *Высокомолекулярные соединения, Серия С*, **54**, 1077–1085.
 31. Потехин, С.А., Егоров, А.Е., Хусайнова, Р.С. (2015) Термодинамический анализ одностадийных переходов при высоком давлении. Теоретическое рассмотрение, *Биофизика*, **60**, 837–842.

32. Mason, J.T., Huang, C.-H. (1981) Chain length dependent thermodynamics of saturated symmetric-chain phosphatidylcholine bilayers, *Lipids*, **16**, 604–608.
33. Nagle, J.F., Wilkinson, D.A. (1978) Lecithin bilayers. Density measurement and molecular interactions, *Biophys. J.*, **23**, 159–175.
34. Mabrey, S., Sturtevant, J.M. (1976) Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3862–3866.
35. Gil, E.S., Hudson, S.A. (2004) Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates, *Prog. Polym. Sci.*, **29**, 1173–222.
36. Alarcon, C.D.H., Pennadam, S., Alexander, C. (2005) Stimuli responsive polymers for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, **34**, 276–285.
37. Graziano, G. (2000) On the temperature-induced coil to globule transition of poly-*N*-isopropylacrylamide in dilute aqueous solutions, *Int. J. Biol. Macromol.*, **27**, 89–97.
38. Bruscolini, P., Buzano, C., Pelizzola, A., Pretti, M. (2002) Lattice model for polymer hydration: collapse of poly(*N*-isopropylacrylamide), *Macromol. Symp.*, **181**, 261–273.
39. Burova, T.V., Grinberg, N.V., Grinberg, V.Y., Tang, Y.T., Zhang, G.Z., Khokhlov, A.R. (2008) Order–disorder conformational transitions of *N*-isopropylacrylamide–sodium styrene sulfonate copolymers in aqueous solutions, *Macromolecules*, **41**, 5981–5984.
40. Schild, H.G. (1992) Poly(*N*-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.*, **17**, 163–249.
41. Loozen, E., Nies, E., Heremans, K., Berghmans, H. (2006) The Influence of Pressure on the Lower Critical Solution Temperature Miscibility Behavior of Aqueous Solutions of Poly(vinyl methyl ether) and the Relation to the Compositional Curvature of the Volume of Mixing, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 7793–7802.
42. Wu, C., Zhou, S. First Observation of the Molten Globule State of a Single Homopolymer Chain, (1996) *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 3053.
43. Schafer-Soenen, H., Moerkerke, R., Berghmans, H., Koningsveld, R., Dusek, K., Solc, K. (1997) Zero and Off-Zero Critical Concentrations in Systems Containing Polydisperse Polymers with Very High Molar Masses. 2. The System Water–Poly(vinyl methyl ether), *Macromolecules*, **30**, 410–416.
44. Grinberg, V.Y., Senin, A.A., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Dubovik, A.S., Potekhin, S.A., Erukhimovich, I.Ya. (2015) High pressure effects under phase separation of aqueous solutions of poly(*N*-isopropylacrylamide): A HS-DSC study, *Polymer* **64**, 14–18.
45. Grinberg, V.Y., Burova, T.V., Grinberg, N.V., Dubovik, A.S., Senin, A.A., Potekhin, S.A., Erukhimovich, I.Ya. (2016) Energetics of phase separation in aqueous solutions of poly(vinyl methyl ether), *Polymer* **87**, 283–289.
46. Finkelstein, A.V., Ptitsyn, O.B. (2002) in *Protein Physics: A Course of Lectures*, Academic Press: New York.
47. Privalov, P.L., Khechinashvili, N.N. (1974) A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study, *J. Mol. Biol.* **86**, 665–684.
48. Liu, Y., Sturtevant, J.M. (1996) The Observed Change in Heat Capacity

- Accompanying the Thermal Unfolding of Proteins Depends on the Composition of the Solution and on the Method Employed To Change the Temperature of Unfolding, *Biochemistry*, **35**, 3059–3062.
49. Makhatadze, G.I., Privalov, P.L. (1995) Energetics of Protein Structure, *Adv. Protein Chem.*, **47**, 307–425.
 50. Privalov, P.L., Gill, S.J. (1988) Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interaction, *Adv. Protein Chem.*, **39**, 191–234.
 51. Makhatadze, G.I., Privalov, P.L. (1993) Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics: I. The Enthalpy of Hydration, *J. Mol. Biol.*, **232**, 639–659.
 52. Privalov, P.L., Makhatadze, G.I. (1993) Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics: II. The Entropy and Gibbs Energy of Hydration, *J. Mol. Biol.*, **232**, 660–679.
 53. Privalov, P.L. (1979) Stability of proteins: small globular proteins, *Adv. Protein Chem.*, **33**, 167–241.
 54. Baldwin, R.L. (2013) Properties of hydrophobic free energy found by gas–liquid transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **110**, 1670–1673.
 55. Spolar, R.S., Livingstone, J.R., Record, M.T. (1992) Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water, *Biochemistry*, **31**, 3947–3955.
 56. Myers, J.K., Pace, C.N., Scholtz, J.M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding *Protein Sci.*, **4**, 2138–2148.
 57. Privalov, P.L., Makhatadze, G.I. (1992) Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding, *J. Mol. Biol.*, **224**, 715–723.
 58. Privalov, P.L., Makhatadze, G.I. (1990) Heat capacity of proteins: II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: Protein unfolding effects, *J. Mol. Biol.*, **213**, 385–391.
 59. Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C. (1996) High pressure effects on protein structure and function, *Proteins*, **24**, 81–91.
 60. Royer, C.A. (2002) Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding, *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 201–209.
 61. Boonyaratankornkit, B.B., Park, C.B., Clark, D.S. (2002) Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 235–249.
 62. Brandts, J.F., Oliveira, R.J., Westort, C. (1970) Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on the denaturation of ribonuclease A, *Biochemistry*, **9**, 1038–1047.
 63. Rasper, J., Kauzmann, W., (1962) Volume changes in protein reactions. I. Ionization reactions of proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1771–1777.
 64. Kauzmann, W., Bodanszky, A., Rasper, J. (1962) Volume changes in protein reactions. II. Comparison of ionization reactions in proteins and small molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1777–1788.
 65. Gross, M., Jaenicke, R. (1994) Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes, *Eur. J. Biochem.*, **221**, 617–630.
 66. Van Eldik, R., Asano, T., Le Noble, W.J. (1989) Activation and reaction volumes in solution, *Chem. Rev.*, **89**, 549–688.

67. Kauzmann, W. (1987) Thermodynamics of unfolding, *Nature*, **325**, 763–764.
68. Dill, K.A. (1990) Dominant forces in protein folding, *Biochemistry*, **29**, 7133–7155.
69. Zipp, A., Kauzmann, W. (1973) Pressure denaturation of metmyoglobin, *Biochemistry*, **12**, 4217–4228.
70. Sawamura, S., Nagaoka, K., Machikawa, T. (2001) Effects of Pressure and Temperature on the Solubility of Alkylbenzenes in Water: Volumetric Property of Hydrophobic Hydration, *J. Phys. Chem. B*, **105**, 2429–2436.
71. Hawley, S.A. (1971) Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen, *Biochemistry*, **10**, 2436–2442.
72. Meersman, F., Dobson, C.M., Hermans, K. (2006) Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions, *Chem. Soc. Rev.*, **35**, 908–917.
73. Roche, J., Caro, J.A., Norberto, D.R., Barthe, P., Roumestand, C., Schlessman, J.L., Garcia, A.E., Garcia-Moreno, B.E., Royer, C.A. (2012) Cavities determine the pressure unfolding of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 6945–6950.
74. Rouget, J.B., Aksel, T., Roche, J., Saldana, J.L., Garcia, A.E., Barrick, D., Royer, C.A. (2011) Size and sequence and the volume change of unfolding, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 6020–6027.
75. Meersman, F., Daniel, I., Bartlett, D.H., Winter, R., Hazael, R., McMillan, P.F. (2013) High-Pressure Biochemistry and Biophysics, *Rev. Mineral. Geochemistry*, **75**, 607–648.
76. Masterton, W.L., Seiler, H.K. (1968) Apparent and partial molal volumes of water in organic solvents, *J. Phys. Chem.*, **72**, 4257–4262.
77. Suzuki, K. (1960) Studies on the kinetics of protein denaturation under high pressure, *Rev. Phys. Chem. Jap.*, **29**, 91–98.
78. Yegorov, A.Y., Potekhin S.A. (2015) Moderate pressure has no distinct impact on hydrophobic hydration of proteins, *Thermochimica Acta*, **610**, 10–15.
79. Kunugi, S., Tanaka, N. (2002) Cold denaturation of proteins under high pressure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 329–344.
80. Zhang, J., Peng, X., Jonas, A., Jonas, J. (1995) NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A, *Biochemistry*, **34**, 8631–8641.
81. Nash, D.P., Jonas, J. (1997) Structure of Pressure-Assisted Cold Denatured Lysozyme and Comparison with Lysozyme Folding Intermediates, *Biochemistry*, **36**, 14375–14383.
82. Panick, G., Vidugiris, G.J., Mallessa, R., Rapp, G., Winter, R., Royer, C.A. (1999) Exploring the temperature-pressure phase diagram of staphylococcal nuclease, *Biochemistry*, **38**, 4157–4164.
83. Meersman, F., Smeller, L., Hermans, K. (2002) Comparative Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of Cold-, Pressure-, and Heat-Induced Unfolding and Aggregation of Myoglobin, *Biophys. J.*, **82**, 2635–2644.
84. Bowron, D.T., Weigel, R., Filipponi, A., Roberts, M.A., Finney, J.L. (2001) X-Ray absorption spectroscopy investigations of the hydrophobic hydration of krypton at high pressure, *Mol. Phys.*, **99**, 761–765.
85. Potekhin, S.A., Senin, A.A., Abdurachmanov, N.N., Tiktopulo E.I. (2009) High pressure stabilization of collagen structure, *Biochim. Biophys. Acta (Proteins and Proteomics)*, **1794**, 1151–1158.

-
86. Shoulders, M.D., Raines, R.T. (2009) Collagen structure and stability, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 929–958.
87. Finkelstein A.V., Shakhnovich E.I. (1989) Theory of cooperative transitions in protein molecules. II. Phase diagram for protein molecule in solution, *Biopolymers*, **28**, 1681–1694.